



Háskóli Íslands
Læknadeild

**Þróun og prófun á tjáningarferjum fyrir DNA bóluefni
og ónæmisglæðum sem örva Th1 ónæmissvar hjá hestum**

Guðbjörg Ólafsdóttir

Leiðbeinandi:
Sigurbjörg Þorsteinsdóttir

Meistaránámsnefnd:
Sigurður Ingvarsson
Sigurveig Þ. Sigurðardóttir

Ritgerð til meistaraprófs við læknadeild
Febrúar 2007

ÁGRIP

Sumarexem er ofnæmi gegn próteinum sem berast í hross við bit smámýs af ættkvíslinni *Culicoides*, en tegundir af þessari ættkvísl lifa ekki hér á landi. Öll hrossakyn geta fengið ofnæmið en það er afar algengt í útfluttum íslenskum hestum. Sumarexemið er ofnæmi af gerð I á Th2 braut en því fylgir framleiðsla á IgE og losun á bólgubáttum. Markmið verkefnisins var að finna leið til að stýra ónæmissvari hesta á Th1 braut. Farnar voru eftirfarandi leiðir að markmiðinu; 1) þróaðar voru tjáningarferjur til DNA bólusetninga, 2) prófaðar voru *in vitro* CpG raðir og peptíð sem nota mætti sem ónæmisglæða, 3) prófaður var *in vivo* Monophosphoryl-lipid A (MPL) tilbúinn Th1 ónæmisglæðir.

Human serum albumin (HSA) gen var notað til að prófa tjáningarferjur og HSA prótein til að bólusetja og örva með í frumurækt. Tjáning próteina í frumurækt var numin í ónæmisþrykki. Mótefni voru mæld með elísuprófi, frumufjölgun með upptöku á thymidini og sett var upp TaqMan rauntíma PCR aðferð til mælingar á boðefnum.

Tjáning HSA á sjö mismunandi spendýratjáningarferjum var borin saman í fjórum gerðum af hestafrumuræktum. Með intron A og heilli Kozak röð tókst að endurbæta tjáningu ferjanna í hestafrumum. Polyarginine (pR) peptíð örvaði hvítfrumur hesta eitt og sér og með vaka en ekki Muramyl dipeptid (MDP). Tóm bluescriptferja og ferja með auka hestastefjum (GTCGTT) örvuðu hestahvítfrumur en ekki ferja með auka músastefjum (GACGTT). Fjórir hestar voru bólusettir þrisvar sinnum með HSA próteini í MPL glæði og til samanburðar myndað HSA ofnæmi í tveimur hestum með HSA í alum glæði. Sem Th1 viðmið var notuð svörun hestanna við γ -herpesveiru. HSA/MPL hestar svöruðu sértækt á HSA með örlítið hærra IFN- γ /IL-4 hlutfalli, mun óstöðugra IgE og svipuðu IgG sniði miðað við HSA/Alum ofnæmishestana. Samanborið við herpes sértækt svar hestanna er vafasamt að MPL glæðir einn og sér sé nægilegur til að Th1 stýra ónæmissvari í fullorðnum hrossum. Hins vegar væri kjörið að nýta aðrar niðurstöður verkefnisins til að bæta um betur. Þannig mætti frumbólusetja með ferjunni, sem best var tjáð í hestafrumum, auka hestastefjum og pR peptíði og endurbólusetja síðan með MPL.

ABSTRACT

Summer eczema (SE) or equine insect bite hypersensitivity (IBH) is a recurrent seasonal dermatitis of horses, an allergy to the bites of *Culicoides* spp. (midges). It is a Th2 immune reaction, a type I hypersensitivity with IgE antibody production and release of inflammatory molecules. All breeds of horses can be affected but Icelandic horses born in Iceland and exported to the continent, are more strongly affected than most other breeds, but *Culicoides* spp. are not native to Iceland. The aim of this study was to find a way to Th1 direct the immune response of horses. The following methods were used to achieve the aim; 1) vectors that could be used for DNA vaccine in horses were developed, 2) CpG motifs and peptides that could be used as adjuvants were tested *in vitro*, 3) the Th1 clinical grade adjuvant Monophosphoryl-lipid A (MPL) was tested *in vivo*.

Human serum albumin (HSA) gene was used to test vectors and HSA protein to vaccinate and stimulate with. Protein expression *in vitro* was monitored in Western blot. Antibodies were measured in ELISA, cell proliferation with thymidine incorporation and a quantitative real time PCR TaqMan method was developed to measure cytokines.

Seven different mammalian vectors were compared for the expression of HSA in four types of horse cells. Increased expression in horse cells was achieved with intron A and whole Kozak consensus. Polyarginine (pR) peptid but not Muramyl dipeptid (MDP) stimulated PBMC from horses by itself and with a specific antigen. Empty bluescript plasmid and plasmid with extra horse motifs (GTCGTT) stimulated PBMC from horses but not plasmid with extra mouse motifs (GACGTT). Four horses were immunised three times with HSA protein and MPL. Allergy was induced in two horses with HSA protein and alum for comparison. Immune response of the horses against γ -herpes virus was used as a Th1 control. The HSA/MPL horses responded with slightly higher IFN- γ /IL-4 ratio, transient but not stable IgE and similar IgG subclass profile as compared with allergic HSA/Alum horses. It is probably not enough to use MPL alone to Th1 direct the immune response of adult horses. For this purpose it would however be worth while to also make use of the *in vitro* results of the project. This could be done by priming horses with the vector, that was most efficiently expressed in horse cells, together with extra CpG's and pR peptid and then boost with MPL.

ÞAKKARORÐ

Ég vil fyrst og fremst þakka Sigurbjörgu Þorsteinsdóttur aðalleiðbeinanda mínum fyrir góða leiðsögn og stuðning. Einnig vil ég þakka öðrum í sumarexemverkefninu þeim Vilhjálmi Svanssyni fyrir gott samstarf og alla aðstoðina og Þórunni Sóley Björnsdóttur fyrir gott samstarf. Þakka öllum í sumarexemhópnum fyrir fræðandi umræður á fundum. Ég vil þakka Sigurði Ingvarssyni og Sigurveigu Þ. Sigurðardóttur sem voru í meistaranámsnefnd.

Samstarfsfólki mínu á rannsóknastofunni vil ég þakka fyrir alla aðstoðina, gott samstarf og sérstaklega fyrir góðan starfsanda. Ég vil sérstaklega þakka öðrum nemum sem að ég vann með á Keldum. Einnig vil ég þakka þeim Guðmundi Einarssyni og Sigurði H. Helgasyni fyrir aðstoð með hestana á Keldum og Ágústi Sigurðssyni fyrir að gefa hesta í verkefnið.

Ég vil þakka samstarfsaðilum okkar í Dýrasjúkdómadeild Háskólans í Bern, Sviss og þá sérstaklega Eliane Marti fyrir gott samstarf og fyrir að sjá um IgE mælingarnar.

Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði að Keldum veitti verkefninu aðstöðu og það var styrkt af Framleiðnisjóði landbúnaðarins, Rannís, Rannsóknánámssjóði (Rannís), Aðstoðarmannasjóði H.Í. og Rannsóknarsjóði H.Í.

EFNISYFIRLIT

ÁGRIP.....	III
ABSTRACT.....	IV
ÞAKKARORÐ.....	V
EFNISYFIRLIT.....	VI
MYNDASKRÁ.....	VIII
TÖFLUSKRÁ.....	IX
LISTI YFIR SKAMMSTAFANIR.....	X
1 INNGANGUR.....	1
1.1 Ónæmiskerfið.....	1
1.1.1 Hvítfrumur ónæmiskerfisins.....	2
1.1.2 Meðfædda ónæmiskerfið.....	2
1.1.3 Áunna ónæmiskerfið.....	4
1.1.3.1 T eitilfrumur.....	4
1.1.3.2 B eitilfrumur.....	7
1.1.4 Ofnæmissvar.....	8
1.2 Ónæmissvörun í hestum.....	11
1.3 Sumarexem.....	12
1.4 Bólusetning, bóluefni og ónæmisglæðar.....	16
1.4.1 DNA bólusetning.....	16
1.4.1.1 Uppbygging og gerð ferju í DNA bóluefni, þættir sem hafa áhrif á tjáningu og ónæmissvar.....	17
1.4.1.2 Ferli ónæmiskynningar við DNA bólusetningu.....	22
1.4.1.3 DNA bólusetning í stærri dýrum.....	23
1.4.1.4 Ónæmisörvandi CpG stef.....	25
1.4.2 Ónæmisglæðar.....	28
1.4.3 Ónæmisskýrandi glæðar.....	29
1.4.3.1 Monophosphoryl-lipid A, MPL.....	29
1.4.3.2 Muramyldipeptide, MDP.....	30
1.4.3.3 Poly-L-arginine, pR.....	30
1.5 Staða verkefnisins.....	31
2 TILGANGUR TILRAUNA.....	33
3 EFNI OG AÐFERÐIR.....	35
3.1 Hestar.....	35
3.1.1 Bólusetningar og blóðtökur.....	35
3.2 DNA-vinna.....	36
3.2.1 Skerðiensím.....	36
3.2.2 Límingar.....	36
3.2.3 Magnmæling DNA.....	37
3.2.4 PCR.....	37
3.2.5 Rafdráttur.....	39
3.2.6 DNA einangrun úr hlaupi.....	39
3.2.7 Raðgreining.....	40
3.2.8 Innskot og plasmíð.....	41
3.3 Bakteríuvinna.....	45
3.3.1 Bakteríufrumur.....	45
3.3.2 Bakteríuæti.....	46
3.3.3 Ummyndun.....	46
3.3.4 Skimun.....	46
3.3.5 Plasmíðeinangrun og hreinsun.....	47

3.4	Frumuvinna.....	47
3.4.1	Frumur og frumuræktun.....	47
3.4.2	Umrækt (Passeringar).....	48
3.4.3	Genaleiðsla (transfection) í frumur.....	48
3.4.4	Ónæmisþrykk (Western blot).....	50
3.4.5	Mæling á β -galactosida virkni úr spendýrafrumum með CPRG.....	50
3.4.6	Einangrun og örvun hvítfrumna úr hestablóði.....	51
3.4.7	Hirðing á frumum.....	52
3.4.8	Einangrun á mRNA.....	52
3.4.9	Myndun á cDNA.....	53
3.4.10	Rauntíma PCR.....	53
3.4.11	Frumufjölgunarpróf.....	55
3.4.12	Elísupróf fyrir HSA sérvirk mótefni hjá hestum.....	56
4	NIDURSTÖÐUR.....	59
4.1	Uppsetning og stöðlun boðefnamælinga.....	59
4.2	Þróun og prófun á tjáningarferjum fyrir hesta DNA bóluefni.....	61
4.2.1	Hönnun og gerð tjáningaferja.....	61
4.2.2	Tjáning ferja athuguð í ónæmisþrykki (WB).....	62
4.3	Prófun á CpG röðum og peptíðum sem örva ónæmissvörun hesta.....	66
4.3.1	Leit að CpG röðum sem örva ónæmissvörun hesta.....	66
4.3.2	Prófað að örva ónæmissvörun hesta með peptíðunum, pR og MDP.....	68
4.3.3	TNF- α og IFN- γ framleiðsla við örvun CpG raða og peptíða.....	72
4.4	<i>In vivo</i> tilraun til að Th1 stýra ónæmissvari hjá hestum með Monophosphoryl- lipid A (MPL) glæði.....	75
4.4.1	HSA sértæk eitilfrumufjölgun hjá hestum bólusettum með HSA/Alum og HSA/MPL.....	75
4.4.2	Mótefnasvörun hjá hestum bólusettum með HSA/Alum og HSA/MPL.....	77
4.4.3	IL-4 og IFN- γ framleiðsla hjá hestum bólusettum með HSA/Alum og HSA/MPL	81
4.5	Mótefna og boðefnasvörun gegn γ -herpesveiru hjá hestum, Th1 ónæmissvar	82
4.5.1	Eitilfrumufjölgun hjá hestum bólusettum með HSA/Alum og HSA/MPL, örvað með γ -herpesveiru.....	82
4.5.2	γ -Herpes sértæk mótefnasvörun hjá HSA/Alum og HSA/MPL hestunum.....	82
4.5.3	IL-4 og IFN- γ framleiðsla eftir γ -herpes örvun.....	84
5	UMRÆÐUR.....	85
5.1	Boðefnamælingar í hestum.....	85
5.2	Samanburður á HSA tjáningu ferja <i>in vitro</i>	86
5.3	Ónæmissvörun hesta við örvun CpG raða og peptíða <i>in vitro</i>	88
5.4	Ónæmissvar hesta sem bólusettir voru með HSA/Alum eða HSA/MPL.....	91
6	HEIMILDASKRÁ.....	95
	VIÐAUKI A.....	103
	VIÐAUKI B.....	104

MYNDASKRÁ

Mynd 1. Þroskun CD4 meyfrumu í verkfrumur og T stjórnfrumur.....	6
Mynd 2. Ofnæmisferli.....	9
Mynd 3. Bólga vegna ofnæmissvars.....	10
Mynd 4. T stjórnfrumur og ofnæmissvar.....	11
Mynd 5. Sumarexem er ofnæmi í hrossum.....	14
Mynd 6. Tjáningarferja.....	18
Mynd 7. T frumu ræsing eftir DNA bólusetningu.....	23
Mynd 8. Samloðunarendar CpG raða.....	45
Mynd 9. Útreikningar boðfnastaðalkúrfa.....	55
Mynd 10. Staðalkúrfur boðfna.....	60
Mynd 11. Staðfesting á HSA innskoti í W1 ferju.....	62
Mynd 12. HSA genið í W2, V1 og V2 ferjunum staðfest með PCR.....	62
Mynd 13. Tjáning HSA gens í COS-7 frumum.....	63
Mynd 14. Tjáning á HSA geni í hestafrumum af mismunandi uppruna.....	64
Mynd 15. Tjáning á HSA geni í hestafrumum af mismunandi uppruna.....	65
Mynd 16. PCR á bluescriptferjum með mismörg innskot af CpG röðum.....	66
Mynd 17. Eitilfrumufjölunarpróf, örvun með raðþynntum Bluescriptferjum.....	67
Mynd 18. Eitilfrumufjölunarpróf, örvun með bluescriptferjum með og án vaka.....	68
Mynd 19. Eitilfrumufjölun, með raðþynningum af peptíðunum með og án HSA.....	68
Mynd 20. Eitilfrumufjölun, örvun með peptíðum.....	69
Mynd 21. Eitilfrumufjölun, örvun með peptíðum og HSA.....	69
Mynd 22. Eitilfrumufjölun, örvun með peptíðum og HSA.....	70
Mynd 23. Eitilfrumufjölun, örvun með peptíðum og HSA.....	70
Mynd 24. Eitilfrumufjölun, örvun með peptíðum með og án HSA.....	71
Mynd 25. Boðfnaframleiðsla, örvun með peptíðum og ferju.....	73
Mynd 26. Boðfnaframleiðsla, örvun með peptíðum og ferju.....	73
Mynd 27. Boðfnaframleiðsla, örvun með peptíðum og ferju.....	74
Mynd 28. Eitilfrumufjölun, HSA örvun á hvítfrumum HSA/Alum hesta.....	76
Mynd 29. Eitilfrumufjölun, HSA örvun á hvítfrumum HSA/MPL hesta.....	76
Mynd 30. Eitilfrumufjölun, HSA örvun á hvítfrumum HSA/MPL hesta.....	77
Mynd 31. Heildar IgG mótefnasvar hjá HSA/Alum hestum.....	78
Mynd 32. Heildar IgG mótefnasvar hjá HSA/MPL hestum.....	78
Mynd 33. IgE mótefnasvar hjá HSA/Alum hestum.....	79
Mynd 34. IgE mótefnasvar hjá HSA/MPL hestum.....	79
Mynd 35. IgG undirflokkasvörun.....	80
Mynd 36. Eitilfrumufjölun, örvað með γ -herpes.....	82
Mynd 37. Heildar IgG og IgG undirflokka mótefnasvar, örvun með γ -herpes.....	83
Mynd 38. Samanburður á IgE mótefnasvari gegn γ -herpesveiru og HSA.....	83

TÖFLUSKRÁ

Tafla 1 Tilraunahestar.....	35
Tafla 2 PCR og raðgreininga vísar.....	38
Tafla 3. Tjáningaferjur.....	41
Tafla 4. Innskot í tjáningarferjur.....	41
Tafla 5. Ferjurnar fyrir rauntíma PCR.....	43
Tafla 6. CpG raðir klónaðar inn í pBluescript SK+ tjáningarferju.....	44
Tafla 7 Vísar og þreifarar fyrir rauntíma PCR.....	54
Tafla 8. Tjáningarferjur.....	61
Tafla 9. Samantekt á frumfjölgunarniðurstöðum.....	71
Tafla 10. Ferjur.....	72
Tafla 11. Boðefnaframleiðsla, örvun með HSA.....	81
Tafla 12. Boðefnaframleiðsla, örvun með γ -herpesveiru.....	84

LISTI YFIR SKAMMSTAFANIR

APC	Antigen presenting cell, sýnifruma
bp	Base pair, basapör
BSA	Bovine Serum Albumin
CAT	Chloramphenicol acetyl transferase
CD	Clusters of differentiation, einkennisameind á yfirborði frumna ónæmiskerfisins
cDNA	complementary DNA
CMV-IE	Cytomegalovirus immediate early gene, stýrill
CPRG	Chlorophenol red β -galactopyranoside
CTL	vakasértækt T drápsfrumusvar
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium, æti
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate: dATP, dCTP, dGTP og dTTP
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
FCS	Fetal calf serum, fósturkálfasermi
HRP	Horseradish peroxidase
HSA	Human serum albumin
i.d.	intradermal, í húð
i.m.	intra muscular, í vöðva
IBH	Equine insect bite hypersensitivity
IFN	Interferon, frumuboði
Ig	Immunoglobulin, ónæmisglóbúlín er byggingarheiti mótefna
IL	Interleukin, hvítfrumuboð
LB	Luria broth, æti
LPS	Lipopolysaccharides
MCS	Multible cloning site, skerðiensímasvæði
MDP	Muramyl dipeptíð
ME	β -mercaptoethanol
MHC	Major histocompatibility complex, vefjaflokkasameind
MPL	Monophosphoryl-lipid A
NLS	Nuclear localization sequence, kjarnainnflutnings röð
ODN	Oligodeoxynucleotides
Ori	Origin of replication, uppruni eftirmyndunar
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns, sameindamunstur sem tilheyra sýklum
PBL	Peripheral blood leukotrienes, eítílfrumur úr blóði
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells, hnattkjarna frumur úr blóði
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase chain reaction, keðjuverkandi fjölliðun
pK	Poly-L-lysine
PO	Phosphodiester, fosfódiester
polyA	Polyadenylation signal
pR	Poly-L-arginine
PRR	Pattern recognition receptor, viðtakar sem þekkja sameindamunstur
PS	Phosphorothioate, fosfórothioate
rpm	Round per minute
RSB	Restriction stop buffer
RSV	Rous sarcoma virus
RT	Real time, rauntími
RT	Reverse transcriptase, víxlriti
RT	Room temperature, herbergishiti
SE	Sumarexem
SV40	Simian virus 40
Th	T helper cell, T hjálparfruma
TLR	Toll like receptor, Toll líkir viðtaki
TNF	Tumor necrosis factor, boðefni
Treg	T regulatory cell, T stjórnfuruma
TSR	Template Suppression Reagent

INNGANGUR

Sumarexem (SE), sem á ensku kallast “equine insect bite hypersensitivity” (IBH) eða “sweet itch”, er langvinnt, árstíðarbundið ofnæmi í hrossum gegn próteinum sem berast við bit smámýs af ættkvíslinni *Culicoides* en þessar flugur kallast "biting midges" á ensku. Ofnæmið er vandamál í íslenskum hestum á erlendri grund en þessi ættkvísl mýflugna lifir ekki á Íslandi. Bitmýið hérlendis er af ættkvíslinni *Simulium* og kallast "black flies" á ensku. Öll hrossakyn geta fengið ofnæmið og það er sérstaklega algengt í íslenskum hestum erlendis. Íslenskir hestar sem fluttir eru út eru næmari en þeir sem alast upp með flugunni erlendis. Sýnt var fram á með faraldsfræðilegri rannsókn að tíðni sumarexems í útfluttum hestum gat verið allt að 50% ef þeir höfðu verið 2 ár eða meira á flugusvæðum og ekkert var gert til að verja þá (Bjornsdottir et al., 2006). Sumarexemið er í flestum tilvikum ofnæmi af gerð I (Type I hypersensitivity) en því fylgir framleiðsla á sértæku IgE, losun á histamíni, leukótrínunum og öðrum bólgubáttum frá mastfrumum og basafrumum.

1.1 Ónæmiskerfið

Varnarkerfi líkamans má skipta í tvennt, meðfædda og áunna ónæmiskerfið. Ónæmiskerfið greinir eigin sameindir frá framandi sameindum sem eru ónæmisvakar og ræsa kerfið til varnar. Fyrstu viðbrögð hýsils gegn sýkingu eru háð meðfædda ónæmiskerfinu sem þekkir hættuboð (danger signals) og bregst við sýklum en skortir getu til að þekkja ákveðin sýkil. Áunnið ónæmissvar er viðbragð vakasértækra eitilfrumna gegn vaka og þróast í ónæmisminni. Áunna ónæmiskerfið byggist á klónavali (clonal selection) eitilfrumna sem hafa mjög sértæka viðtaka sem gerir ónæmiskerfinu kleift að þekkja utanaðkomandi vaka. Við áunnið ónæmissvar fjölga vakasértækar eitilfrumur sér og þroskast í verkfrumur (effector cells) sem útrýma vanalega sýklinum. Áunna ónæmissvarið framleiðir einnig langlífir minnis eitilfrumur þannig að við endursýkingu fæst hraðara og skilvirkara svar. Hvítfrumur (leukocytes) eru frumur ónæmiskerfisins og eru myndaðar frá forverafrumum í beinmerg og flokkast m.a. í kornfrumur (granulocytes) og eitilfrumur (lymphocytes).

1.1.1 Hvítfrumur ónæmiskerfisins

Í blóðinu eru kornfrumur; daufrumur (neutrophils), sýrufrumur (eosinophils) og basafrumur (basophils) sem við sýkingu og bólgu fara inn í vef og þroskast í verkfrumur. Stórætur (macrophages) og mastfrumur (mast cells) ljúka þroskuninni í vefjum þar sem þær eru verkfrumur í fremstu línu varnasvars hýsils og hefja bólgusvar. Stórætur innbyrða og eyða bakteríum og kalla til aðrar átfrumur eins og daufrumur úr blóði. Mastfrumur seyta með útfrumun frymiskorna (exocytic), þ.e. seyta út bólguhvetjandi efnum eins og histamíni þegar vefur verður fyrir hnjaski og eru taldar stjórna varnarsvari gegn sníkjudýrum og einnig koma af stað ofnæmis bólgusvari. Þær kalla á vettvang sýrufrumur og basafrumur sem einnig seyta með útfrumun frymiskorna. Angafrumur (dendritic cells) koma inn í vef sem óprokskaðar frumur þar sem þær sérhæfast, innbyrða vaka og fara inn í eitla sem sýnifrumur (antigen presenting cell). Frumurnar taldar upp hér að ofan eru verkfrumur meðfædda ónæmiskerfisins sem sjá um át, hreinsistörf og sýningu á ónæmisvökum. NK frumur eru eitilfrumur en teljast til meðfædda ónæmiskerfisins vegna skorts á sértækum viðtökum.

Verkfrumur áunna ónæmiskerfisins eru eitilfrumur, B eitilfrumur sem þroskast í beinmerg og T eitilfrumur sem þroskast í hóstarkirtli (thymus). Ræsing áunna ónæmissvarsins verður þegar T fruma þekkir ákveðinn vaka á yfirborði sýnifrumu (t.d. angafrumu). Þrjú helstu starflíffæri ónæmiskerfisins eru; milta sem safnar vökum úr blóði, eitlar sem safna vökum frá sýktum aðliggjandi vef og eitlar sem tengdir eru slímhúðum og safna vökum frá þeim. Áunna ónæmissvarið hefst í þessum starflíffærum ónæmiskerfisins þar sem T frumur rekast á vaka, fjölga sér og þroskast í vakasértækar verkfrumur meðan B frumurnar með hjálp frá T frumum fjölga sér og þroskast í mótefna-seytandi frumur.

1.1.2 Meðfædda ónæmiskerfið

Meðfædda ónæmiskerfið er margþætt og til þess telst meðal annars yfirborð líkamans eins og húð og slímþekja o.fl. en það hindrar að sýklar komist inn í líkamann. Ef sýkill kemst í gegnum þessa ytri hindra taka við önnur varnakerfi eins og leysanleg prótein og lífvirkar litlar sameindir sem má alltaf finna í utanfrumuvökvanum (t.d. magnaprótein (complements) og defensins) eða er seytt úr úr frumum þegar þær eru ræstar (t.d. boðefni sem hafa áhrif á aðrar frumur, bólguboðefni sem laða að

bólgufrumur o.fl. prótein og ensím). Einnig notar meðfædda ónæmiskerfið mismunandi viðtaka til að þekkja og bregðast við sýkli (Chaplin, 2006). Þeir hvítfrumuviðtakar sem þekkja yfirborð sýkils bindast oft endurteknum einingum sem mynda munstur eins og sykrum eða fitu einingum sem má finna á yfirborði örvera (pathogen associated molecular patterns, PAMP) en ekki á frumum hýsilsins og eru hættuboð og kallast viðtakarnir því “pattern-recognition receptors, PRR”. Sumir af þessum viðtökum eins og mannósaviðtaki á stórátfrumu ræsa agnaát meðan aðrir ræsa seytingu sameinda sem áthúða sýkil en það ýtir undir að hann sé étinn eða með því að virkja magnakerfið. Viðtakar meðfædda ónæmiskerfisins sem þekkja sýkla gegna einnig því hlutverki að ræsa bólguvar, draga að fleiri verkfrumur, varna því að sýkingin dreifist og ræsa áunnið ónæmissvar. Áunna ónæmissvarið er ræst með ákveðinni viðtakafjölskyldu sem kallast Toll-líkir viðtakar (Toll-like receptors, TLR). TLR eru PRR sem þekkja og bregðast við sameindamunstrum sem má finna á yfirborði og inn í sýklum. TLR virkja NFκB umritunarþætti sem koma af stað umritun margra gena, þar á meðal þeirra sem tjá boðefni, bólguboð og hjálparboðsameindir sem eru ómissandi við að stýra svári áunna ónæmiskerfisins. Helst má finna TLR á stórátfrumum og angafrumum en þeir eru einnig á dauffrumum, sýrufrumum, þekjufrumum og hrynifumum. Þekktir eru 10 mismunandi TLR í mönnum og ná viðtakarnir í gegnum frumuhimnuna með utanfrumuhneppi sem er leusín-rikt og innanfrumuhneppi sem er líkt innanfrumuhneppi IL-1 viðtaka (Toll/IL-1 receptor, TIR) sem er mikilvægt hneppi til að koma boðum áleiðis (Chaplin, 2006; Kaisho and Akira, 2006). Flestir viðtakarnir eru yfirborðs gegnumhimnuþrótein nema tveir (TLR3 og TLR9) sem eru inni í frumunni og má skipta þeim í hópa eftir því hvað þeir þekkja, þ.e. fitu, prótein eða kjarnsýrur. TLR4 þekkir lipopolysaccharide (LPS) sem er utan á gram-neikvæðum bakteríum. Aðrar bakteríur, sem ekki hafa LPS, hafa t.d. peptíðsykrur, fituþrótein eða fitupeptíð sem TLR1, TLR2 og TLR6 viðtakar þekkja. TLR5 þekkir próteinið flagellin sem er á svipubakteríum. Hátt hlutfall af ómetíleruðum CpG stefjum er að finna í bakteríu- og veiru erfðaefti sem TLR9 þekkir. TLR7 og TLR8 viðtakar nema einþátta RNA eða veirusameindir eins og imidazoquinoline. TLR3 viðtakinn þekkir dsRNA sem er í veirusýktum frumu (Kaisho and Akira, 2006).

TLR boð í gegnum TIR geta leitt til virkjunar á nokkrum umritunarþáttum eins og NF-κB og mismunandi IRF (IFN regulatory factor). Flestir TLR virkja svipaða boðleið en sumir TLR virkja sér boðleið. TLR2/4 virkja MyD88-háða boðleið

(TIRAP/MyD88 - IRAK4 - TRAF6 - TAK1 - IKK β - I κ B/NF κ B). TLR3/4 virkja MyD88 óháða boðleið sem er TRIF háð (TRIF - mismunandi ferli sem leiða til ræsingar á IRF-3 eða NF κ B). TLR7/9 virkja MyD88 háða boðleið (MyD88 - mismunandi ferli sem leiða til ræsingar á IRF-7 eða NF κ B). TLR ræsa framleiðslu á bólguboðefnum eins og IL-1, IL-6 og TNF- α . Flestir TLR örva sýnifrumur til að framleiða IL-12 og IL-18 sem ýta undir Th1 frumuþroskun. Einnig ræsa sumir TLR framleiðslu á interferonum af gerð I (Type I IFN) eins og IFN- α og IFN- β sem eru mikilvægir í ónæmissvörun gegn innanfrumu veirusýkingum (Kaisho and Akira, 2006; Suzuki and Saito, 2006).

1.1.3 Áunna ónæmiskerfið

Það sem einkennir áunna ónæmiskerfið er hæfileiki til að greina á milli eigin sameinda og utanaðkomandi sameinda, fjölbreytileiki, nákvæmni og minni. Eitilfrumur hafa tvö aðskilin kerfi til að þekkja utanfrumu og innanfrumu sýkla. B frumur hafa á yfirborði frumunnar ónæmisglóbúlín sem viðtaka (B cell receptor, BCR) fyrir vaka og við ræingu seyta frumurnar ónæmisglóbúlínunum sem eru leysanleg mótefni sem veita vörn gegn sýklum í utanfrumuvökvanum. T frumur hafa viðtaka (T cell receptor, TCR) sem þekkja peptíðbúta innanfrumu sýkla sem hafa verið fluttir með vefjaflokkasameindum (major histocompatibility complex, MHC) upp á frumuyfirborð sýnifruma. Tveir flokkar MHC sameinda, MHC I og MHC II, flytja peptíð frá mismunandi innanfrumulíffærum til að sýna þau mismunandi gerðum af verkfimum T frumna: CD8 T drápsfrumum sem drepa sýktar markfrumur og CD4 T frumur sem aðallega virkja stórátfrumur og B frumur. T frumur sjá um frumubundna ónæmissvarið og veita einnig B frumum mikilvæga hjálp við mótefnasvar áunna ónæmiskerfisins.

Eitt af mikilvægustu hlutverkum áunna ónæmiskerfisins er verndandi ónæmi gegn endursýkingu og er háð eitilfrumum sem miðla langlífu ónæmisminni.

1.1.3.1 T eitilfrumur

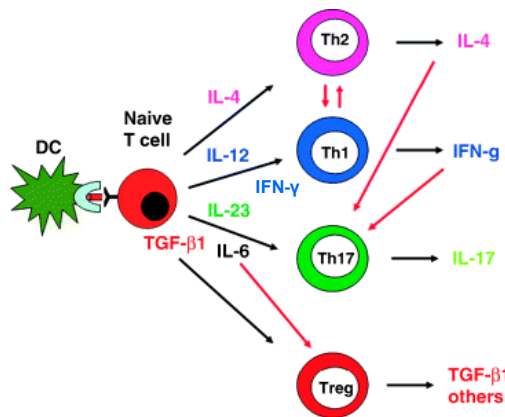
Hver T eitilfruma hefur TCR sem er sértækur, þ.e. engir tveir viðtakar eru eins vegna klónavals. Hver viðtaki binst ákveðnu peptíði á vefjaflokkasameind. Boð gegnum TCR er háð CD3 sameindaflóka á T frumunni. Til að T fruma örvist við bindingu

vaka þurfa að koma til viðbótar hjálparboðsameindir, sem eru CD28 á T frumu og CD80 (B7.1) eða CD86 (B7.2) á sýnifrumum. Í hóstarkirtli þroskast T frumur í undirhópa og tjá mismunandi hjálparviðtaka sem hægt er að nota sem auðkenni, CD4 hjálparviðtaki á T hjálparfrumum (helper cells, Th cells) eða CD8 hjálparviðtaka á T drápsfrumum (cytotoxic T cells). CD4 og CD8 eru hjálparviðtakar í samskiptum T frumna við sýnifrumur en þeir auka stöðugleika með því að tengjast MHC vefjaflokkasameindunum þegar TCR binst vaka á MHC. T frumur sem tjá bæði CD4 og CD25 og seyta TGF- β og IL-10 hafa aðra virkni og teljast til T stjórnfrumna (Chaplin, 2006).

Sýning ónæmisvaka fyrir T frumur fer eftir tveimur leiðum, innrænu og útrænu leiðinni. Innanfrumusýklar eða vakar eru sýndir af vefjaflokkasameind I (MHC class I). Stórt fjöleininga meltiensím (proteasome) brýtur niður prótein sýkils eða vaka sem er í umfrymi í peptíð, um 8-12 amínósýrur að lengd, sem flutt eru inn í frymisnet (endoplasmic reticulum, ER) af próteinum sem flytja inn peptíð (transporters associated with antigen processing, TAP) og bindast þar vefjaflokkasameindum I. Vefjaflokkasameindir með peptíði flytjast upp að yfirborði frumu í gegnum golgikerfið. CD8 T frumur þekkja vakann sem vefjaflokkasameindir I sýna á yfirborði frumunnar. Utanfrumu sýklar eða vakar eru sýndir af vefjaflokkasameindum II (MHC class II). Þegar prótein koma inn í frumu frá utanfrumurými eru þau eðlissvipt og brotin niður í peptíð búta, 12-20 amínósýrur af lengd í innanfrumubólum (lysosomes). Þessi peptíð bindast vefjaflokkasameindum II sem síðan eru fluttar að yfirborði frumunnar og sýndar vakasértækum CD4 T frumum (Hartl et al., 2004; Marciani, 2003).

Th frumurnar þroskast í verkfrumur með mismunandi virkni eftir því hvaða boðefni og hjálparboðsameindir eru til staðar þegar sýnifrumur ræsa þær. CD4 T meyhjálparfrumur (naïve Th cells) skiptast í þrjá flokka, Th1, Th2 og Th17 frumur, eftir því hvaða boðefnum þær seyta eftir örvun (sjá mynd 1). CD4 T meyfuma sem örvuð er af sýnifrumu sem seytir IL-12 um leið, þroskast í verkfrumu sem framleiðir IFN- γ , IL-2 og TNF- β og kallast Th1 fruma. IL-12 er aðallega framleitt af stórátfrumum og angafrumum. Einnig er þroskun í Th1 frumu háð IFN- γ sem framleitt er af annarri frumu meðfædda ónæmiskerfisins, líklega NK frumu eða $\gamma\delta$ T frumu. CD4 T meyfuma sem örvuð er af sýnifrumu þegar IL-4 er í umhverfinu, þroskast í verkfrumu sem framleiðir IL-4, IL-5, IL-9 og IL-13 og kallast þá Th2 fruma. Upphaf þroskunar í Th2 frumu er ekki að fullu þekkt en það er ekki vitað

hvaða fruma framleiðir IL-4 í byrjun, hvort það er Th meyfruman sjálf, mastfruma og/eða basafruma, $\gamma\delta$ T frumu eða NK.1.1 T fruma (Corthay, 2006; Romagnani, 2004). Almenn sér Th1 um frumubundna ónæmissvarið, þ.e. varnir gegn innanfrumusýklum t.d. veirum og innanfrumu bakteríum. Th2 brautin sér aðallega um vörn gegn utanfrumusýklum t.d. snikjudýrum, tekur þátt í mótefnasvari og ofnæmisviðbrögðum af gerð I (Chaplin, 2006). Þroskun Th17 frumna frá Th meyfrumu er háð TGF- β , IL-6 og IL-23 og eru Th17 verkfrumur þekktar af IL-17A, IL-17F og IL-6 boðefnaframleiðslu. Th17 verkfrumur sjá líklega um varnir gegn utanfrumubakteríum og aukning á þeim er einnig talin eiga þátt í því að magna upp sjálfsöfnæmiskvilla (Harrington et al., 2006; Romagnani, 2006; Weaver et al., 2006).



Mynd 1. Þroskun CD4 meyfrumu í verkfrumur og T stjórnfurur.

Meyfruma þroskast í Th2 frumu þegar IL-4 er í umhverfinu en IL-12 og IFN- γ stuðla að Th1 frumuþroskun. IL-23, IL-6 og TGF- β stuðla að Th17 þroskun. T stjórnfurur þroskast að tilstuðlan TGF- β . IL-4 hamlar Th1 frumum, IFN- γ hamlar Th2 frumum og bæði IL-4 og IFN- γ hamla Th17 frumum. IL-6 hamlar Treg frumuþroskun. Svartar örvar tákna jákvæða virkni, rauðar örvar tákna hamlandi virkni. Mynd breytt frá (Romagnani, 2006).

T stjórnfurur (regulatory T cells, Treg) bæla ónæmisviðbrögð með frumufrumu tengingu eða með því að seyta boðefnum. Treg frumur mynda þol með því að koma í veg fyrir ræsingu og starfsemi T verkfruma. Hluti Treg frumna þroskast í hóstarkirtli, eru sértækar fyrir sjálfsvaka (auto/self-antigens) og kallast náttúrulegar (natural) CD4⁺CD25⁺ Treg. Aðrar frumur þroskast fyrir utan hóstarkirtlinn við útsetningu fyrir utanaðkomandi vaka/ofnæmisvaka og kallast þá áunnar Treg frumur (Stock et al., 2006). Nokkrar gerðir af Treg frumum hafa verið skilgreindar og má þar helst nefna náttúrulegar CD4⁺CD25⁺ Treg frumur, Tr1, Th3 frumur, Qa-1-restricted

CD8⁺ T frumur, CD8⁺CD28⁻ T frumur, CD8⁺CD122⁺ T frumur, $\gamma\delta$ T frumur og NKT frumur (Sakaguchi, 2006; Taylor et al., 2005).

Náttúrulegar Treg frumur (CD4⁺CD25⁺ Treg) þroskast í hóstarkirtli, eru um 5-10% af CD4⁺ frumum líkamans og eru sértækar fyrir eigin vaka. Náttúrulegar Treg tjá CD25 (IL-2 viðtaki), cytotoxic T lymphocyte-associated prótein 4 (CTLA-4), glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor (GITR), umritunarþáttinn Foxp3 og programmed death-1 (PD-1). Náttúrulegar Treg frumur bæla með því að koma í veg fyrir IL-2 tjáningu T markfrumna en til þess nota þær CTL-4, TGF- β og PD-1. Skortur á náttúrulegum Treg frumum skapar hættu á sjálfsöfnæmissjúkdómum (Stock et al., 2006; Taylor et al., 2005).

Áunnar Treg frumur þroskast fyrir utan hóstarkirtilinn við snertingu við utanaðkomandi vaka og framleiða mikið af IL-10 eða TGF- β og getur verið um fleiri en eina gerð að ræða. Áunnar Treg frumur geta bælt Th1 eða Th2 ofnæmisvakasvar með mörgum bæliferylum, þar á meðal með því að seyta IL-10 og/eða TGF- β og með viðtökunum CTL-4 og PD-1 (Stock et al., 2006; Taylor et al., 2005). Tr1 frumurnar seyta miklu magni af IL-10 og framleiða einnig TGF- β . Th3 frumur framleiða mismunandi mikið af IL-4 og IL-10 en mikið af TGF- β . $\gamma\delta$ T frumur hafa TCR viðtaka úr γ og δ keðjum en aðrar T frumur hafa TCR viðtaka úr α og β keðjum. $\gamma\delta$ T frumur þekkja ekki vaka sem sýndur er af vefjaflokkasameindum heldur virðast þær þekkja vaka beint. $\gamma\delta$ T frumur seyta IL-10 og TGF- β (Taylor et al., 2005). Það virðist vera nauðsynlegt að ræsa sértækar ofnæmisvaka Treg frumur til að viðhalda heilbrigðu ónæmissvari gegn ofnæmisvaka (Taylor et al., 2005).

1.1.3.2 B eitifrumur

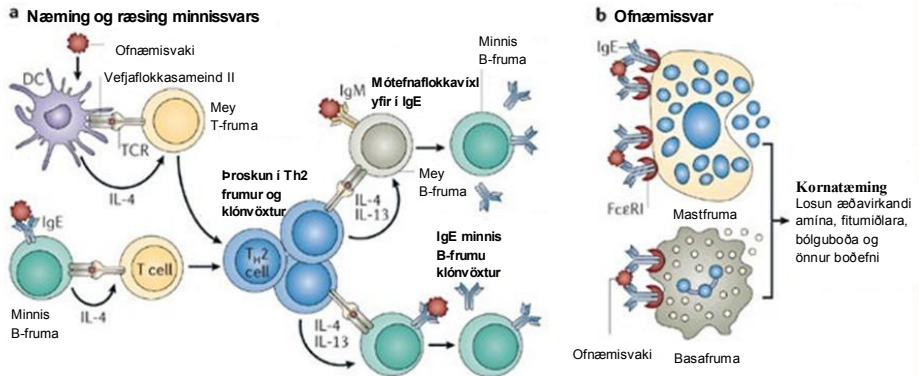
Hver B eitifruma hefur viðtaka (B cell receptor, BCR) sem eru sértækir vegna klónavals og bindast ákveðinni vakaeiningu. Aðalmunurinn á hvernig BCR og TCR þekkja vaka er að BCR þekkir yfirleitt þrívíddarbyggingu vaka en TCR þekkir aðeins stutt línuleg peptíð á vefjaflokkasameindum I og II. Til að ræsa B frumur þarf annars vegar krosstengingu vaka við nokkra BCR og síðan tengingu á milli CD40 á B frumum og CD40L (CD154) á T frumum. T hjálparfrumur þekkja peptíðbút sem að B frumurnar sýna þeim með vefjaflokkasameind II sem verður til þess að þær tengjast B frumum með CD40L ásamt fleiri viðtökum og seyta boðefnum (IL-4, IL-5 og IL-6) til að örva B frumurnar. Við ræsingu B frumna í gegnum BCR byrja frumurnar að seyta

ónæmisglóbúlín (immunoglobulín, Ig) út í utanfrumurýmið og þau bindast samskonar vaka. Binding mótefna við vaka stuðlar m.a. að ræsingu magnakerfisins, hvetur til agnaáts vaka með áthúðun og hlutleysingu sýkils eða bakteríueiturs.

Mótefnasvar sem er háð T frumum byrjar á IgM seytingu sem breytist þó fljótlega í framleiðslu á öðrum mótefnaflokkum (isotypes) fyrir tilverkan boðefna frá T frumum. Hver mótefnaflokkur hefur ákveðna staðsetningu og hlutverk. IgM er aðallega í blóði og virkjar magnakerfið. IgG mótefni eru aðallega í blóði og í utanfrumuvökva þar sem þau hlutleysa eitur, veirur og bakteríur, áthúða þau fyrir agnaát og ræsa magnakerfið. IgA mótefni eru í slímhúð þar sem að þau hlutleysa eitur og veirur og koma í veg fyrir að bakteríur komist í gegnum þekjuvef meltingarvegs. Yfirleitt eru IgE mótefni bundin við yfirborð mastfrumna sem dvelja undir þekjuvef líkamans og sjá um staðbundið varnarsvar. Verkfrumur þekjja sýkla sem þaktir eru að mótefnum með Fc viðtökum sem ræsa frumurnar til að eyða sýklunum annað hvort með agnaáti eða útfrumun frymiskorna eða bæði.

1.1.4 Ofnæmissvar

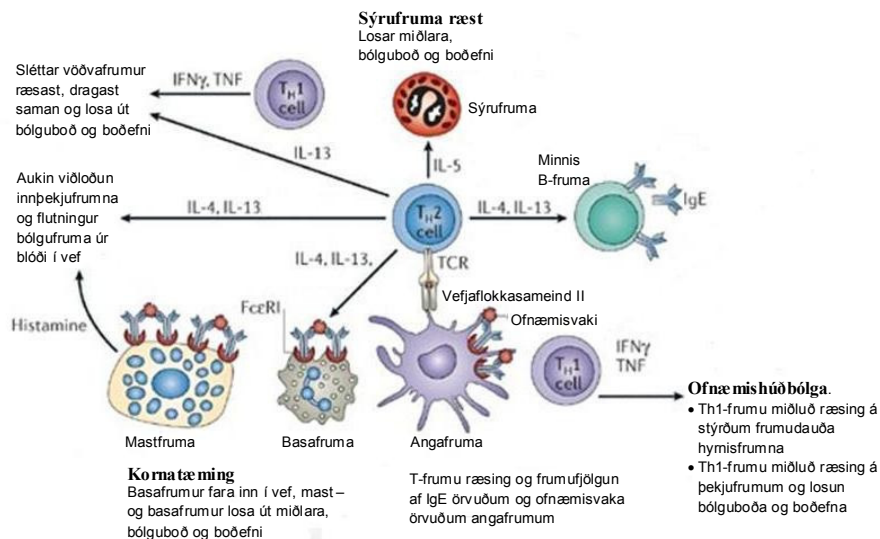
Ofnæmisviðbragð verður þegar einstaklingur framleiðir IgE mótefni gegn “meinlausum” vaka, sem kallast þá ofnæmisvaki. Ofnæmisvakinn ræsir frumur sem hafa IgE á yfirborðinu, eins og mastfrumur og basufrumur, með því að krossbinda IgE sem leiðir af sér röð viðbragða sem eru skilgreind sem ofnæmi (sjá mynd 2). Ofnæmi er einn flokkur af viðbrögðum ónæmiskerfisins sem kallast ofurnæmissvar (hypersensitivity reaction). Ofurnæmissvar er ónæmisviðbragð gegn skaðlausum vökum sem leiðir til sjúkdómseinkenna. Ofurnæmissvar er flokkað í fjórar gerðir. Gerðir I-III eru miðlaðar af mótefnum. Gerð I (type I hypersensitivity) er bráðafnæmi miðlað af IgE mótefni sem ræsir mastfrumur. Gerð II (type II hypersensitivity) er IgG mótefnamiðlað ofnæmi gegn vökum í millifrumuefni eða frumuyfirborðsviðtökum. Gerð III (type III hypersensitivity) er IgG mótefnamiðlað ofnæmi gegn leysanlegum vökum og er fléttumiðlað ofnæmi. Gerð IV (type IV hypersensitivity) er T frumumiðlað ofnæmi sem skiptist í 3 undirflokkar sem er skilgreint eftir því hvaða T frumur eiga í hlut, Th1, Th2 eða T drápsfrumur.



Mynd 2. Ofnæmisferli.

a) Ofnæmisvakakynning og þroskun sértækra minnis B fruma og T fruma. Sérhæfing og klónvöxtur vakasértækra Th2 frumna sem leiðir til framleiðslu á IL-4 og IL-13 sem ræsir mótefnaflokkavíxl yfir í IgE. b) Ofnæmissvar. Krossstenging ofnæmisvaka á yfirborði mast- og basafrumna leiðir til losunar á bólgumiðlandi efnun. Mynd einfölduð og íslenskuð eftir (Larche et al., 2006).

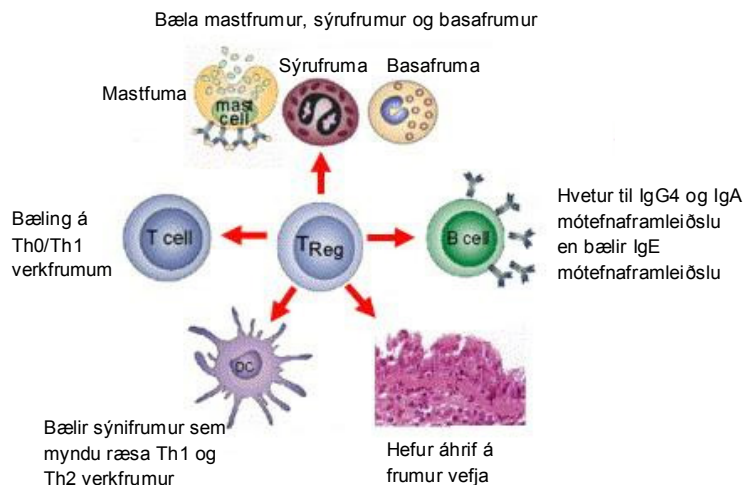
Ofnæmisviðbrögð verða vegna framleiðslu sértækra IgE mótefna gegn meinlausum vaka, ofnæmisvaka. Vakarnir koma inn í líkamann og ræsa Th2 svar. Vakasértækar Th2 frumur framleiða IL-4 og IL-13 sem fær vakasértækar B frumur til að framleiða IgE (sjá mynd 2a). Sértæku IgE mótefnin bindast Fc viðtaka á mastfrumum og basafrumum og ræsa sýrufrumur. Við örvun þessara frumna tjá þær CD40 viðtaka og framleiða IL-4 og geta með því ýtt undir enn frekari IgE framleiðslu. Þegar vaki krossbindur IgE á yfirborði mastfruma veldur það því að frumurnar losa mikið af bólgumiðlandi efnun (sjá mynd 2b). Bólguvarið skiptist í snemmbúið svar sem einkennist af efnun sem vara stutt eins og histamín og síðbúið svar þar sem leukotrín, boðefni og bólguboð laða að og ræsa sýrufrumur og basafrumur. Síðan getur viðbragðið breyst í þrálátar bólgu sem einkennast af T verkfrumum og sýrufrumum (sjá mynd 3).



Mynd 3. Bólga vegna ofnæmissvars

Sértækar ofnæmisvaka T frumur flytjast inn í vef, þar sem ofnæmisvaki hefur komið inn, vegna bólguboða og annara boðefna og ræsast og fjölga sér. Sjá nánari útskýringar á mynd. Mynd einfölduð og íslenskuð eftir (Larche et al., 2006).

Ofnæmi er talið stafa af ójafnvægi milli ofnæmisvakasértækra Th1 og Th2 frumna og einnig vegna ójafnvægis milli ofnæmisvakasértækra Treg frumna og Th2 frumna (Larche, 2006). Hærra hlutfall af IL-4 seytandi ofnæmisvakasértækum T frumum og minna hlutfall af IL-10 seytandi ofnæmisvakasértækum Treg frumum mælist í einstaklingum með ofnæmi miðað við heilbrigða einstaklinga (Stock et al., 2006). Náttúrulegar og áunnar Treg frumur bæla ofnæmisvakasértækar verkfrumur. Þær hamlar IgE framleiðslu með því að seyta IL-10 og TGF- β og auka um leið framleiðslu á mótefnum sem taka ekki þátt í bólgusvari svo sem IgG4 og IgA. Treg frumur bæla beint eða óbeint verkfrumur sem taka þátt í bólgusvari ofnæmis eins og mastfrumur, basafrumur og sýrufrumur. Þær bæla sýnifrumur sem myndu ræsa annað hvort Th1 og Th2 verkfrumur og síðan bæla Treg frumur einnig Th1 og Th2 frumur (sjá mynd 4) (Akdis et al., 2005).



Mynd 4. T stjórnfurumur og ofnæmissvar.

Mynd íslenskuð úr (Akdis et al., 2005).

1.2 Ónæmissvörun í hestum

Ónæmissvörun í hestum er miðlað af sömu hvítfrumutegundum og ferlum og í öðrum spendýrum. Th1 og Th2 svör hjá hrossum hafa aðeins verið rannsökuð (Coombs et al., 2006; Cordeau et al., 2004; Davidson et al., 2005; Paillot et al., 2005) en gen boðefnanna sem einkenna Th1/Th2 ferlana og Treg hafa mörg hver verið klónuð úr hestafrumum (Cunningham et al., 2003; Dohmann et al., 2000; Giguere and Prescott, 1999; Horohov, 2000; Kato et al., 1995; Nicolson et al., 1999; Steinbach et al., 2002; Swiderski et al., 2000) og talið líklegt að ferlarnir séu svipaðir og hjá músum og mönnum. Mótefnaflokkar hjá hestum eru þeir sömu og í músum og mönnum (IgM, IgG, IgA, IgE). Hestar hafa IgA, IgM, IgG og IgE og alla vega eitt IgD gen (Wagner et al., 2004). Fjóra IgG undirflokka hesta er hægt að nema með einstofna mótefnum og eru nefndir IgGa, IgGb, IgGc og IgG(T) (Lunn et al., 1998b). IgGa og IgGb binda magna en IgG(T) hlutleysir eiturnar en er lélegt í magnabindingu, áthúðun og mótefnabundnu frumudrápi (Lunn et al., 1998a). Kortlagning á IgG þungu keðju svæðinu hefur leitt í ljós sjö IgG mótefnaflokka og út frá því hafa undirflokkarnir verið nefndir upp á nýtt; IgGa → IgG1, IgGb → IgG4, IgGc → IgG6 en IgG(T) stendur fyrir tvo undirflokka, IgG3 og IgG5. IgG2 og IgG7 hafa ekki enn fundist á prótein formi (Wagner, 2006). Mótefnasvar með tilliti til Th1/Th2 ónæmissvars hefur

verið skoðað og virðist IgGb (IgG4) vera ráðandi í veirusýkingu eða Th1 svári en IgGa (IgG1) og IgG(T) (IgG3/5) í ofnæmi (Hellberg et al., 2006; Mizukoshi et al., 2002; Wagner et al., 2006).

1.3 Sumarexem

Einkenni sumarexems eru húðbreytingar og kláði sem algengast er að sjá í makka og sterti. Í sumum tilfellum sjást þó húðbreytingar víðar svo sem á eyrum, höfði, lend og kvið. Fyrstu einkenni eru roði og bólguupphleypt húð, oft með seytingu á blóðvökva sem storknar og myndar gular skorpur. Exeminu fylgir mikill kláði. Hesturinn sækir í að nudda sér utan í hluti og eykur það ertinguna í húðinni, oft með þeim afleiðingum að sár myndast og getur bakteríusýking komið í kjölfarið. Í langvinnum tilfellum sést þykkun á húðinni og hárleysi. Í versta falli verða hrossin ónothæf til brúkunar, reiðar eða vinnu, og þau þarf jafnvel að aflífa (Anderson et al., 1988; Riek, 1953).

Í bráða útbroti (acute lesion) eru vefjameinafræðilegar breytingar meðal annars bjúgur, útfrumun frymiskorna úr mastfrumum og íferð sýrufruma úr nærliggjandi æðum. Einnig sést aukning á fjölda angafrumna sem tjá vefjaflokkasameindir af flokki II og CD2 T frumna. Langvinnt (chronic) ástand sjúkdómsins einkennist af bandvefsmyndun í húð með þykkun yfirhúðar (hyperplasia) og siggmeins (ofvöxtur í hornlagi húðþekju, hyperkeratosis). Í langvinnum útbrotum eru oftast ífarandi eitilfrumur með fáum eða engum sýrufrumum (Foster et al., 1995; Kurotaki et al., 1994; McKelvie et al., 1999; Riek, 1953).

Með því að sprauta *Culicoides* seyði í húð hesta með sumarexem eykst íferð hvítfrumna (mononuclear), s.s. CD3 eitilfrumna sem flestar eru CD4 og einnig sést aukning á sýrufrumum (Foster et al., 1995; McKelvie et al., 1999).

Sumarexem er ofnæmi í hrossum gegn próteini sem berst við bit smámýs af ættkvíslinni *Culicoides* sem kallast "biting midges" eða "no-seeums" á ensku. Ofnæmið er vandamál í íslenskum hestum á erlendri grund en þessi ættkvísl mýflugna lifir ekki á Íslandi. Bitmýið hér er af ættkvíslinni *Simulium* sem kallast "black flies" á ensku. Sumarexemið er í flestum tilvikum ofnæmi af gerð I (Type I hypersensitivity) en því fylgir framleiðsla á IgE, losun á histamíni, leukótrínunum og öðrum bólguþáttum (Fadok and Greiner, 1990; Halldorsdottir et al., 1989; Hellberg et al., 2006; Marti et

al., 1999; Wagner et al., 2006; Wilson et al., 2006; Wilson et al., 2001).

Ónæmissvarið er á svokallaðri Th2 braut.

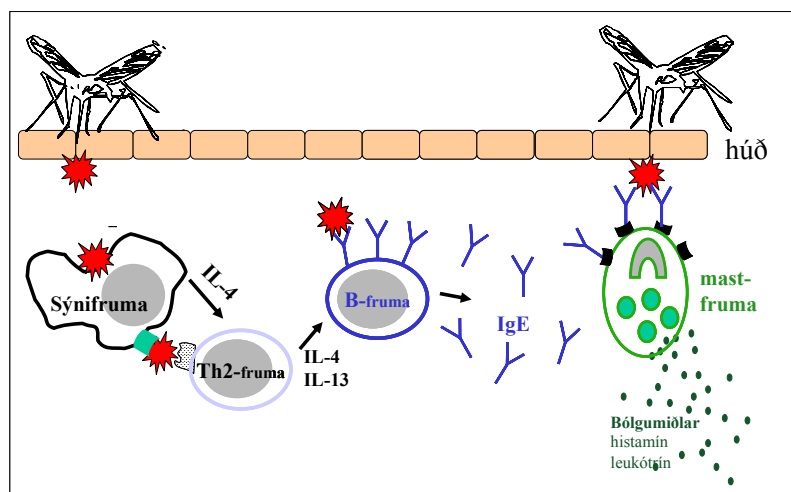
Þegar hestar eru komnir með ofnæmi gegn *Culicoides* eru þeir flestir einnig komnir með ofnæmi gegn *Simulium* og öðrum bitflugum (Baselgia et al., 2006; Fadok and Greiner, 1990; Quinn et al., 1983). Sýnt hefur verið fram á að margar tegundir *Culicoides* ættkvíslarinnar valda sumarexemi en það er breytilegt eftir landsvæðum hvaða tegundir eru ríkjandi. Líklega eru sameiginlegir ofnæmisvakar í þeim tegundum sem hafa verið prófaðar því hestar með sumarexem svara á *Culicoides* tegundir sem finnast ekki á því svæði sem hestarnir eru frá (Anderson et al., 1993).

Sýnt hefur verið fram á að sumarexem er IgE miðlað ónæmissvar (Wagner et al., 2006). Húðsýni úr hestum með SE innihalda marktækt meira af IgE, IgE mRNA jákvæðum frumum og tryptase jákvæðum mastfrumum en húðsýni úr heilbrigðum hestum (van der Haegen et al., 2001). Einnig hefur verið sýnt fram á losun bólgumiðlandi þátta (histamine og sulfidoleukotrienes) úr eitilfrumum úr blóði (PBL) eftir *in vitro* örvun með *Culicoides* og *Simulium* seyði. Örvunin er marktækt meiri hjá hestum með SE en heilbrigðum hestum (Baselgia et al., 2006; Marti et al., 1999). Ónæmislitun á *Culicoides* vefjasneiðum sýndi að mótefni úr sermi hesta bindast próteinum í bitvökvakirtlum *Culicoides* mýflugna og einnig í nokkrum tilvikum við prótein í görnun. *Culicoides* IgE sértæk mótefni greindust í hestum með SE en ekki í heilbrigðum hestum. Aftur á móti fundust sértæk IgG mótefni bæði í hestum með SE og heilbrigðum hestum sem alist höfðu upp með *Culicoides* flugunni. Engin mótefni gegn *Culicoides* próteinum í vefjasneiðum greindust úr hestum á Íslandi (Wilson et al., 2001). Í bitvökvakirtlum *C. nubeculosus* eru a.m.k 10 prótein sem binda IgE úr SE hestum. Þar af eru 5 prótein sem binda sermi úr meira en 50% SE hesta og má ætla að þessi 5 prótein séu aðal ofnæmisvakarnir (Hellberg et al., 2006).

Íslenskir hestar með SE hafa marktækt herra heildar IgE en heilbrigðir íslenskir hestar. Aftur á móti var ekki hjá öðrum hrossakynjum marktækur munur á heildar IgE milli þeirra sem voru með SE og heilbrigðra. Hestar sem alist höfðu upp á Íslandi höfðu hátt heildar IgE sem lækkaði fyrsta árið eftir innflutning. Heildar IgE hélst lágt í íslenskum hestum sem voru heilbrigðir en hækkaði marktækt hjá þeim sem fengu SE (Wilson et al., 2006). Sýnt hefur verið fram á að IgG(T) og IgGa geta átt þátt í ofnæmisviðbrögðum í hestum en þessi mótefni bundust próteinum úr bitvökvakirtlum *C. nubeculosus* (Hellberg et al., 2006). En einnig benda niðurstöður

til þess að IgG(T) geti bundist við mastfrumur og ræst þær og þannig haft áhrif á ofnæmissvar í hestum (Wagner et al., 2006).

Nokkrir rannsóknarhópar hafa kannað ónæmisviðbrögð sumarexemhesta í húðprófi með mismunandi hugsanlegum ónæmisvökum. Þessi húðpróf hafa sýnt fram á að hestar með SE fá bólgusvar innan við klukkutíma þegar þeir eru sprautaðir með *Culicoides* seyði sem bendir til að SE sé ofnæmi af gerð I. Aftur á móti sýna sumir SE hestar síðkomin ofnæmisviðbrögð sem koma fram um sólahring eftir að þeir hafa verið sprautaðir í húð með *Culicoides* seyði. Það gefur til kynna að sjúkdómurinn geti seinna meir þróast yfir í síðkomið ofnæmi líkt og þekkt er hjá mönnum (Type IV hypersensitivity) (Anderson et al., 1996; Barbet et al., 1990; Fadok and Greiner, 1990; Ferroglio et al., 2006; Halldorsdottir et al., 1989; Kurotaki et al., 1994).



Mynd 5. Sumarexem er ofnæmi í hrossum.

Flugan spýtir inn próteinum um leið og hún sýgur blóð og í vissum einstaklingum þá ákveður sýnifruman að beina svari við þessum próteinum á Th2 braut með framleiðslu á IgE ofnæmismótefninu. Næst þegar hesturinn verður fyrir biti flugunnar þá hafa þessar IgE mótefnasameindir, sem eru sérvirkar fyrir próteinum úr flugunni, raðað sér utan á mastfrumur í húð og basafurur í blóði. Um leið og próteinið kemur aftur þá krossbindur það IgE sameindirnar á þessum frumum með þeim afleiðingum að þær ræsast og seyta histamínunum leukótínunum og öðrum bólgumiðlum sem valda ofnæmiseinkennum.

Öll hrossakyn geta fengið ofnæmið og er það þekkt út um allan heim. Í tempraða hitabeltinu verður sjúkdómsins vart frá vori og fram á haust þegar *Culicoides* eru virkar, en er í rénum yfir vetramánuðina (Wilson et al., 2001). Hjá hestum fæddum í löndum þar sem sumarexem er þekkt koma fyrstu einkennum oftast

fram við 2ja-4ra vetra aldur og versnar með hverju sumri. Tíðni sumarexem tilvika er mismunandi eftir svæðum í heiminum eða allt frá 3 til 60% (Anderson et al., 1988; Braverman et al., 1983; Littlewood, 1998; McCaig, 1973; Nakamura et al., 1956; Riek, 1953).

Í Svíþjóð fengu um 26% innfluttra íslenskra hesta ofnæmið en aðeins 7% íslenskra hesta sem fæddir voru þar (Brostrom et al., 1987). Könnun á íslenskum hestum í Noregi leiddi í ljós að 27% innfluttir hestar fengu sumarexem en aðeins 8,2% hesta fæddra þar (Halldordsottir and Larsen, 1991). Báðar þessari kannanir voru byggðar á spurningalistum sem sendir voru til eigenda.

Eins og kom fram hér að ofan þá geta öll hrossakyn fengið ofnæmið og er það afar algengt í íslenskum hestum erlendis. Íslenskir hestar sem fluttir eru út eru næmari en þeir sem alast upp með flugunni erlendis. Sýnt var fram á með faraldsfræðilegri rannsókn að tíðni sumarexems í útfluttum hestum gat verið um 50% ef þeir höfðu verið 2-3 ár eða meira á flugusvæðum og ekkert var gert til að verja þá (Bjornsdottir et al., 2006). Sumir hafa jafnvel birt hærri tíðni eða 72% (Lange et al., 2005). Aftur á móti fá 7-18% íslenskir hestar sem fæddir eru erlendis sumarexem (Bjornsdottir et al., 2006).

Það er ekki til nein góð lækning eða lyfjameðferð við ofnæminu en til að koma í veg fyrir sumarexem er besta ráðið að hýsa hestana þegar *Culicoides* flugurnar eru virkastar þ.e. við sólsetur og sólarupprás yfir heitustu mánuðina. Ráðlegt er að hafa þétt flugnanet fyrir öllum gluggum og opum á húsinu (Anderson et al., 1988). Einnig er hægt að klæða hestinn í ábreiðu til að verja hann biti. Ýmis smyrslí og flugnafælar hafa líka verið notaðar með misgóðum árangri. Tvö lyf hafa verið notuð við sumarexemi en það eru antihistamine og glucocorticosteroids (Anderson et al., 1988).

Ónæmismeðferð gæti verið möguleg meðferð við ofnæminu en þær hafa enn ekki gefið nógu góða raun gegn sumarexeminu. Í þeim ónæmismeðferðum sem reyndar hafa verið, hefur verið notast við heilar *Culicoides* flugur og byrjað á því að gefa lítinn skammt en auka hann síðan (Anderson et al., 1996; Barbet et al., 1990). Sá hængur er á meðferðinni að sprauta þarf hestana vikulega í allt að 2 ár og skammtastærðirnar þarf að meta fyrir hvern einstakling hverju sinni og erfitt er að staðla aðferð þegar notuð er heil lífvera en ekki skilgreint prótein. Til að þróa þessa aðferð áfram þyrfti að finna hina eiginlegu ofnæmisvaka í þeirri von að þá væri hægt að framleiða og nota í afnæmingu (hyposensitizing extract) (Anderson et al., 1996).

1.4 Bólusetning, bóluefni og ónæmisglæðar

Bólusetning felst í því að ræsa áunna ónæmiskerfið. En til þess þarf fyrst að ræsa meðfædda ónæmiskerfið, t.d. bólguviðbragð, því annars ræstist áunna ónæmissvarið ekki. Ónæmisvakinn í bóluefninu verður að geta ræst ákveðnar T eitilfrumum og B eitilfrumum þannig að til verði minnisfrumur þessara eitilfrumna. Þegar minnisfrumur hitta svo ónæmisvakann aftur við sýkingu verður ónæmissvarið miklu öflugra. Tilgangur allra bólusetninga er að framkalla langlíft minnisvar.

Bóluefni eru af nokkrum gerðum;

- lifandi eða veikluð bóluefni,
- örverur sem eru ekki lifandi (afvirkjaðar),
- hlutar eða afurðir örvera,
- bóluefni framleidd með erfðatækni
- DNA bóluefni.

Í flestum bólusetningum þarf að notast við ónæmisglæða (adjuvants). Þess er ekki þörf þegar notaðir eru lifandi meinvaldar eða óvirk toxin þeirra. Í hinum tilfellunum eru meinvaldarnir ekki full virkir og ónæmisglæðana þarf til þess að ræsa meðfædda ónæmiskerfið. Ónæmisglæðir er hvert það efni sem eykur ónæmisvekjandi áhrif þess efnis sem það er blandað við.

Með bólusetningum hefur verið hægt að útrýma nokkrum sjúkdómum í mönnum. Bóluefni gegn ýmsum sýklum hafa bætt heilsu manna síðustu 100 ár en enn er þörf á bóluefnum gegn berklum, eyðni og malaríu. Undirstaða þess að búa til bóluefni er að finna og framleiða vaka og ónæmisglæði sem kalla fram viðeigandi, sértækt ónæmissvar til að fá ónæmi. Mikil þróun hefur átt sér stað í bóluefnisrannsóknum í þá átt að einangra eitur eða prótein frá sýklinum eða tjá með erfðatækni (endurröðuð prótein, peptíð eða plasmíð DNA). Helsti gallinn er að þessir einangruðu vakar vekja oft ekki nógu sterkt ónæmissvar og þurfa hjálp frá ónæmisglæðum (Brewer, 2006; Lima et al., 2004). Einnig er horft til þess að þróa bóluefni eða ónæmismedferðir gegn ofnæmi og krabbameinum.

1.4.1 DNA bólusetning

Genabólusetning eða DNA bólusetning er nýleg bólusetningaraðferð. Síðastliðin 15 ár hafa margar tilraunir sýnt fram á að nota má bólusetningu með erfðaeefni eða geni, s.s.

DNA bóluefni, til að hafa áhrif á þá stefnu sem ónæmissvarið tekur (Hartl et al., 2004). DNA bóluefni eru yfirleitt plasmíðferju DNA sem umritar vakasameind inni í génaeiddri (transfected) frumu ákveðins markvefs. DNA bóluefni vekur bæði mótefnasvar og frumubundið ónæmissvar (Thalhamer et al., 2001). Þessa bólsetningaraðferð er hægt að nota til að mynda verndandi ónæmi gegn veiru-, bakteríu- og sníkjudýra sýkingum, og hún hefur einnig opnað nýja möguleika í bólusetningum gegn krabbameini. DNA ónæmissaðgerð hefur lofað góðu í meðferð gegn ofnæmi (Hartl et al., 2004).

Helstu kostir DNA bóluefna eru að þau eru ódýr og einföld í framleiðslu. Hægt er að setja fleiri en eitt gen á tjáningarferjuna og framleiða með því marggilt bóluefni gegn fjölda sýkingarvalda.

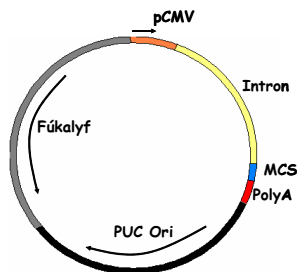
DNA bóluefni getur stýrt því hvaða frumur ónæmiskerfisins svara t.d. með því að koma fyrir genum ýmissa boðefna á tjáningarferjunni sem ræsa mismunandi frumur ónæmiskerfisins.

DNA bólusetning er öflug í að ræsa frumubundna ónæmissvarið, örvar t.d. sérvirkar drápsfrumur sem er mjög mikilvægt í veirubóluefni, þar sem sérvirkar drápsfrumur eru yfirleitt aðalvörnin í veirusýkingu. Mótefnasvörun er hins vegar ekki mjög öflug. Þetta er öfugt við hefðbundin próteinbóluefni með alum ónæmisglæði sem leiða nær eingöngu til mótefnamyndunar.

DNA bóluefni hafa reynst vel í músum, en erfiðara hefur verið að fá fram nægilega sterka svörin í stærri spendýrum (Babiuk et al., 2003).

1.4.1.1 Uppbygging og gerð ferju í DNA bóluefni, þættir sem hafa áhrif á tjáningu og ónæmissvar

Tjáningarferjur til bólusetninga í spendýrum eru vanalegast uppbyggðar á eftirfarandi hátt. Í fyrsta lagi innihalda þær uppruna eftirmyndunar (origin of replication, ori) og valgen (selection marker) til að geta fjölfaldað og viðhaldið ferju þegar hún er framleidd í miklu mæli í bakteríum. Í öðru lagi tjáningarsvæði sem er stýrill (promoter), skerðiensímasvæði (multible cloning site, MCS) og polyadenylation signal (polyA) (sjá mynd 6). Í þriðja lagi verða tjáningarferjurnar að hafa táknröð fyrir vaka (Ertl and Thomsen, 2003).



Mynd 6. Tjáningarferja.

Þættir sem hafa áhrif á ónæmissvar við DNA bólusetningu

Hægt er að ákvarða með mismunandi breytum magn og gerð ónæmissvars sem fæst eftir DNA ónæmingu. Þeir þættir sem notaðir eru og hægt er að stjórna til að auka það ónæmissvar sem óskað er eftir eru: (1) gerð heilkjarna stýrils og/eða efliraðar; (2) gerð vakans og staðsetning hans í frumunni; (3) CpG stef á ferjunni; (4) auka ferjur í fjöl-DNA bólusetningar blöndu og (5) boðefnagen. Breytur sem hægt er að hafa áhrif á við gjöf/innsetningu (administration) á DNA bóluefninu eru: (1) hvaða leið er notuð til að koma ferjunni inn; (2) bólusetningaraðferð; (3) magn ferju; (4) endurbólusetning og (5) tími milli bólusetninga. Að lokum ber að hafa í huga breytu sem ekki er auðvelt að hafa áhrif á og það er mótefni úr móður í mörgum afkvæmum (van Drunen Littelvan den Hurk et al., 2000).

Framleiðsla í bakteríum

Framleiðsla á tjáningarferju er auðveldari ef henni er viðhaldið í mörgum eintökum í bakteríufrumum en þá fæst mikið DNA magn úr hverri frumu. Til að geta framleitt mikið af tjáningarferjunni er gott að nota ferju af pUC uppruna en hún hefur eiginleika til að endurmynda sjálfa sig í miklum mæli (high copy number origin) (Ertl and Thomsen, 2003). Best er að hafa ferjuna eins litla og hægt er til að auðvelda genainnleiðslu inn í frumur (Babiuk et al., 2003).

Valgen

Á tjáningarferjunni er yfirleitt ákveðin röð sem gerir bakteríuna, sem ferjan er í, ónæma fyrir fúkalyfjum. Sýklalyfjapól er nauðsynlegt til að geta valið rétta bakteríu og ræktað upp. Forðast ber að nota pencillin eða önnur β -lactam sýklalyf vegna hættu á ófnæmisviðbrögðum. Kanamycin eða neomycin eru leyfileg fúkalyfjavalgen í DNA bóluefnum (Ertl and Thomsen, 2003).

Stýrlar og innraðir

Öflugann stýril þarf sem gefur mesta tjáningu á vaknum og er yfirleitt notaður “human cytomegalovirus immediate early gene” stýrill (CMV-IE). Einnig eru til aðrir veiru stýrlar eins og SV40 (simian virus 40) og RSV (Rous sarcoma virus LTR) og spendýra stýrlar eins og β -actin og α -globin. Það skiptir miklu máli að próteinið sé tjáð í sem mestu magni *in vivo* en próteinmagnið ræðst að mestu af stýrlinum og merki fyrir polyA hala (polyadenylation signal) (Ertl and Thomsen, 2003). Sýnt hefur verið fram á að fylgni er á milli mótefnasvars og frumubundis ónæmissvars annars vegar og styrkleika stýrilsins hins vegar. Sterkara ónæmissvar fékkst ekki með því að auka skammtinn af ferju sem var með veikari stýril (Babiuk et al., 2003). Mesta tjáningin fæst þegar CMV-IE er í fullri lengd og þá er fyrsta innröðin frá IE1 geninu sem kallast intron A innifalin. Með því að sleppa intron A fæst miklu minni stýrill en aftur á móti minni tjáning, en það má að einhverju leyti bæta upp með því að halda eftir fyrsta exoninu af E11 geninu sem staðsett er á milli stýrilsins og intron A. Efliröð sem staðsett er fyrir ofan stýrilinn má einnig fjarlægja til að minnka ferjuna en það hefur þau áhrif að tjáning minnkar (Ertl and Thomsen, 2003). Intron A virðist skipta máli fyrir flutning á mRNA innan frumu. Það er nauðsynlegt fyrir RNA veiru og bakteríugen sem eru venjulega ekki umrituð í kjarna en innröð hefur engin áhrif á gen DNA veiru. Líklega virkar CMV intron A á þann hátt að það feli (overriding) óæskileg tákni eða bæti við ómissandi táknum sem vantar í mRNA-ið (Babiuk et al., 2003). Sum spendýragen eru háð splæsingu við mRNA umritunina og til að fá fram hámarks tjáningu er betra að hafa intron A með (Gurunathan et al., 2000). Talið hefur verið að þau áhrif sem innraðir hafa á tjáningu séu aðallega til að auka hraða RNA polyadenylation og/eða útflutning úr kjarna sem tengist RNA splæsingu. Þær upplýsingar liggja fyrir að röð í introni A sé samsvarandi (homologous) við ákveðin vöðvastjórnunarbátt og að CMV stýrill/efliröð með introni A gefi meiri aukningu á tjáningu í vöðvafrumum en í lifrarfrumum músa (Xu et al., 2001).

Staðsetning gens

Gen vakans er sett inn í ferjuna á skerðiensímasvæðinu og þá þarf að tryggja að lesramminn sé réttur og huga að polyA halanum svo genið sé flutt út úr kjarna. Gott er að hafa valmöguleika á mismunandi skerðiensímum til að setja vakann inn á ferjuna. Best er að hafa eins lítið af auka röðum inn á endanlegri tjáningarferju og reyna því að setja gen vakans eins nálægt 5' og 3' endum stýrilsins og polyA. Röð vakans sem sett

er inn á ferju er hægt að taka beint á DNA formi og þá er klippt með skerðiensímum eða magnað upp með PCR ef genið er ósplæst eða af cDNAi. Oftast er röðin mögnuð upp með PCR og þá er hægt að bæta við skerðisetum á 5' og 3' endana. Best er að setja inn náttúrulegann opinn lesramma (open reading frames, orfs) vakans fyrir framan upphafstáknann ef hann er þekktur en með því fæst Kozak röðin sem umlykur upphafstáknann (Ertl and Thomsen, 2003).

Polyadenylation signal

Polyadenylation signal af mismunandi uppruna hefur verið notað og þar á meðal veiru signal eins og SV40 og spendýra signal eins og kanínu globin eða nauta vaxtarhormón signal (bovine growth hormone, BGHPA) en það er oftast notað (Ertl and Thomsen, 2003).

Kozak

Kozak kenniröðin við AUG byrjunartáknann á mRNA hefur áhrif á þýðingu spendýragena en ribósóm heilkjörnunga þekkja þessa röð. Rannsóknir hafa sýnt að Kozak röð skiptir miklu máli til að þýðing á spendýrageni sé skilvirk. Best er þegar Kozak röðin nær utan um upphafstáknann en dæmigerð Kozak röð er 5'-GCCA/GCCAUGG-3'. Kozak raðir eru breytilegar en mestu máli skiptir að þremur bösum fyrir ofan upphafstákna sé púrin (niturbasi með 2 hringi, A eða G) og gúanin strax á eftir upphafstákna (5-'G/ANNAUGG-3'). Gen dreifkjörnunga og sum gen heilkjörnunga hafa ekki Kozak röð en auka má tjáningu þessara gena ef Kozak röð er sett fyrir framan þau (Garmory et al., 2003).

Táknaskipting

Þó vaki hafi verið setur inn á ferju fæst ekki endilega góð tjáning. Það geta verið margar ástæður fyrir lélegri tjáningu vakans eins og annars stigs bygging eða stöðugleiki eða flutningur mRNA, hamlandi stjórnraðir innan vakans eða sjaldgæfir tákna (codons). Sjaldgæfum táknum er hægt að skipta út fyrir algengari tákna með því að breyta röð gensins með hjálp erfðatækni. Hlutfall tákna er ekki eins hjá mismunandi lífverum s.s. spendýrum, sníkjudýrum, veirum, bakteríum og plöntum. Hagræðing á táknum getur aukið tjáningu á vaka (Babiuk et al., 2003; Ertl and Thomsen, 2003).

Merkiraðir

Ef ekki eru til mótefni gegn vakanum þarf einhvers konar merki (tag) eins og poly-histidine tag eða V5 inn á ferjuna til að nema tjáningu. En þessi merki eru kannski ekki leyfð í endanlegu bóluefni. Gott er að hafa T7 promoter/primer svæðið fyrir ofan

genið til að sýna fram á að vakinn sé umritaður og réttur en losna þarf við allar svona auka raðir í endanlegu bóludefni (Ertl and Thomsen, 2003).

Boðefnagen

Boðefni er fjölbreyttur hópur af ónæmisáhrifavöldum (ónæmisstýrisameindum) eða stjórnpóteín sem eru ómissandi í varnasvari hýsils við sýklum. Hlutverk mismunandi boðefna við að stjórna fjölbreyttum þáttum ónæmissvars er hægt er að nýta sem ónæmisglæða til að auka ónæmissvar við bóludefni. Boðefni á ferjum hafa verið mikið rannsökuð sem efnilegir ónæmisglæðar fyrir DNA bóludefni í forklíniskum líkönum og eru núna nokkur að fara í fyrsta fasa klínísk próf (early-phase clinical trials). Þar sem ofnæmi er Th2 svar er mestmegnis horft á stjórnsameindir sem ýta undir Th1 svar s.s. boðefnin IL-12, IL-18 og IFN- γ (Barouch et al., 2004; Weiss et al., 2006).

Hjálparsameindir

Ýmsar hjálparsameindir hafa verið notaðar til að auka ónæmissvar við DNA bóludefni og má þar nefna CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), CTLA-4, ICAM-1, CD154 (CD40L) og CD28. B7 hjálparsameind á ferju gefin með DNA bóludefni jók vakasértækt T-drápsfrumusvar (CTL) en CTLA4 jók mótefnasvar. Annars er virkni hjálparsameinda í T frumu svari flókin og ólík og getur verið mismunandi milli vaka (Babiuk et al., 2003).

T frumur þekkja vakaeiningar (epitopes) og nýleg aðferð þar sem ubiquitin er fast við vakann ýtir undir að hann sé brotinn niður í vakaeiningar, sýndur af vefjaflokkasameind I og það leiðir frekar til Th1 ónæmissvars (Gurunathan et al., 2000; Weiss et al., 2006). Þetta á líka við um ef LAMP-1 (lysosomal-associated membrane protein 1) er bætt við vakann. Með því að auka niðurbrot eykst fjöldi peptíða sem sýnifrumurnar geta sýnt (Ertl and Thomsen, 2003). Með því að bæta E3 leader röð frá adenoveiru á ferjuna er vakinn leiddur beint inn í frymisnetið (ER) og binst þar við vefjaflokkasameind I sameind án þess að þurfa hjálp frá TAP flutningasameindinni. E3 leader röðin bætti CTL svarið fyrir suma vaka en ekki aðra (Gurunathan et al., 2000).

Hægt er að bæta við röðum á ferjuna sem eru tjáðar með vakanum og hafa þau áhrif að vaka er seytt út úr frumunni eða binst við frumuhimnuna en það hefur í sumum tilvikum aukið vessabundið ónæmissvar (Ertl and Thomsen, 2003; Gurunathan et al., 2000).

Það er ekki nóg að genainnleiða DNA bólusetningarferjuna inn í frumuna, hún þarf að komast inn í kjarnann en það er áætlað að minna en 1% af genainnleiddri

DNA bólusetningarferju sem kemst inn í frumu komist inn í kjarna. Ráð til að auka innflutning er að bæta við kjarnainnflutningsröð (nuclear localization sequence, NLS) (Babiuk et al., 2003). Einnig er verið að þróa bóluefni þar sem reynt er að koma bóluefni til skila inn í viðeigandi angafrumu (Reddy et al., 2006).

Inngjöf bóluefnis

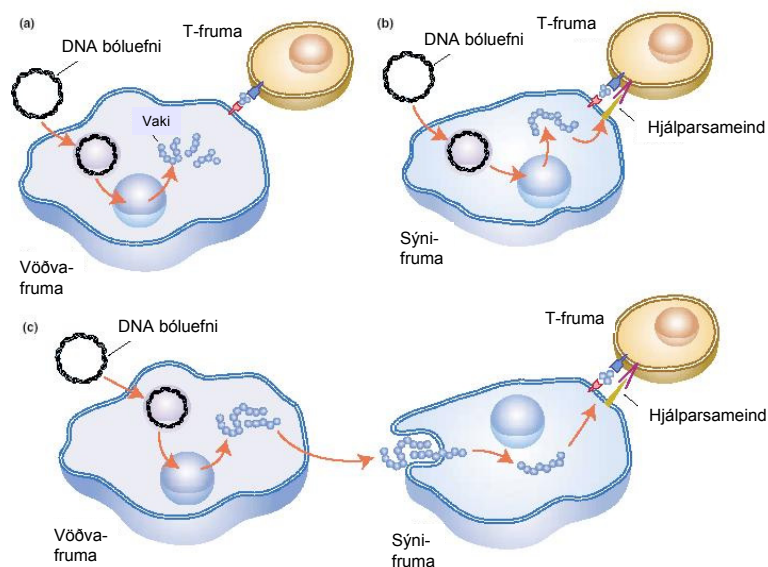
DNA bóluefni hefur verið gefið eftir nokkrum leiðum í mismunandi vef, t.a.m. í vöðva (intra muscular, i.m.), í húð (intra dermal, i.d.), í æð (intravenous, i.v.), í kvíðarhol (intra peritoneal, i.p.), í gegnum yfirhúð með öramyndun (scarification), í slímhúð um munn (oral), í nef (intra nasal), leggöng (vaginal) og í gegnum húð án ífarandi aðgerðar (noninvasive). Algengasta bólusetningarleiðin hefur verið í vöðva (Gurunathan et al., 2000). Mismunandi bólusetningaraðferðir hafa verið notaðar eins og inndæling (injection) DNA bólusetningarferju í saltvatni (saline), í efnasambandi við fituefni, og með því að þrýsta/skjóta inn (impelling) DNA bóluefninu annað hvort sem loftúða (aerosol) eða húðað á gullagnir beint inn í yfirhúð og leðurhúð með rafstuði eða gasþrýstingi (t.d. helíum) (Lai and Bennett, 1998). Auðvelt er að útbúa sprautuinndælingu með því að blanda DNA ferjunni við saltvatn. Það sem “biolistic” tækni, eins og genabyssa og Bioinjector 2000, hafa fram yfir hefðbundar sprautunaraðferðir er meiri skilvirkni. Það þarf um 100 sinnum minna af DNA í mýs til að fá sambærilegt mótefnasvar miðað við nálargjöf. Sá galli er á gjöf Njarðar að það fæst ekki sama ónæmissvarið með sama plasmíðinu ef gefið er með “biolistic” aðferðinni eða með sprautu í vöðva, sprautunaraðferðin kallar fram Th1 svar en genabyssa frekar Th2 svar. Fjöldi skammta, magn og tími milli skammta hefur áhrif á ónæmissvarið (Doria-Rose and Haigwood, 2003).

1.4.1.2 Ferli ónæmiskynningar við DNA bólusetningu

Vaka sýningaferlið og ræsing ónæmissvars í kjölfar DNA bólefnis er ekki að fullu þekkt. Sýning ónæmisvaka fyrir T frumur fer eftir tveimur leiðum eins og lýst er í kafla 1.1.3.1.

Það er talað um þrjár mögulegar leiðir fyrir vakasýningu eftir DNA bólusetningu (sjá mynd 7). Sú fyrsta er að sýnifrumur (professional APC) genaleiðist beint, t.d. angafruma og tjái og sýni vakann. Önnur möguleg leið er bein frumónæming breyttra líkamsfrumna, t.d. vöðvafrumna eða hrynifrumna en þá er aukagen á ferjunni sem tjáir hjálparsameind og getur líkamsfruman ræst T frumur

beint. Þriðja leiðin er kross-ónæming (cross-priming) þar sem ferju DNA genaleiðist inn í líkamsfrumu og/eða sýnifrumu og prótein sem seytt er frá genaleiddri frumunni er tekið upp af sýnifrumu og sýnt T frumum (Cui, 2005; Gurunathan et al., 2000).



Mynd 7. T frumu ræsing eftir DNA bólusetningu.

Rannsóknir í músum hafa sýnt að eftir bólusetningu með tjáningarferju DNA sem skráir fyrir ákveðinn vaka, ræsast T frumur af sýnifrumum sem (b) annað hvort hafði verið genaleiddar beint af DNA ferjunni eða (c) fengið vaka gegnum kross-ónæmingu, þar sem fruma sem er ekki sýnifruma hefur upprunalega tjáð prótein DNA bólu efnisins og flutt í einhverju formi yfir í sýnifrumuna sem sýnir vakann með vefjaflokkasameind I T frumu. (a) Vöðvafrumur taka upp DNA bólu efni og framleiða meira af próteininu en aðrar frumur *in vivo* en skortir hjálparsameindir til að ræsa T frumur. Mynd íslenskuð eftir (Liu, 2003).

1.4.1.3 DNA bólusetning í stærri dýrum

DNA bólu efni virka afar vel í músum en þegar á að yfirfæra tæknina í stærri dýr þá hefur árangurinn ekki verið eins góður og í raun er enn verið að vinna grunnvinnu á því sviði (Babiuk et al., 2003; van Drunen Littel-van den Hurk et al., 2000).

Ómæmissvar í stærri dýrum hefur fengist með DNA bólusetningu, s.s. T drápsfrumu-, mótefna- og mismunandi gerð af T hjálparfrumu svari og er gerð svars og styrkur háð sjúkdómnum, vakanum, dýramódelinu og bólusetningar aðferðum (Cui, 2005).

Yfirleitt fæst alltof lágt svar sem þarfnast eflingar með prótein endurbólusetningu. Oft

er reynt að beina svarinu á Th1 braut með DNA bólusetningu og efla svo með próteini.

Verið er að þróa og prófa nokkur DNA bóluefni gegn sjúkdómum í húsdýrum og hafa sum hver veitt vörn gegn sýkingu t.d. í minkum, svínum, nautgripum og fuglum (Castelruiz et al., 2005; van Drunen Littel-van den Hurk et al., 2000). Eftir DNA bólusetningu hefur verið sýnt fram á hlutleysandi mótefni gegn veirum sem valda munnblöðrubólgu (vesicular stomatitis virus) (Cantlon et al., 2000), æðabólgu (equine arteritis virus) (Giese et al., 2002), og afrískri hrossapest (african horsesickness virus) (Romito et al., 1999). Í afrísku hrossapestinni fékkst einnig marktækt frumubundið svar (Romito et al., 1999). Mótefnasvar gegn *Rhodococcus equi* fékkst eftir DNA bólusetningu sem var fylgt eftir með prótein endurbólusetningu í folöldum (Lopez et al., 2003). Ögrun var ekki reynd í þessum tilraunum.

Gefið hefur verið leyfi fyrir notkun tveggja DNA bóluefna gegn veirusýkingum í hestum, en þau eru gegn hestainflúensu og gegn “West Nile” veirusýkingu (Minke et al., 2004). Mótefna- og frumubundin ónæmissvör (IgG_A, IgG_B og IFN- γ) fengust eftir DNA bólusetningu sem varði folöld gegn hestainflúensu veirusýkingu (Lunn et al., 1999; Soboll et al., 2003).

Með því að setja gen vaka sem veldur ofnæmi inn í tjáningarferju og nota til að bólusetja með, má beina ónæmissvarinu á Th1 braut sem veitir vernd frá Th2 braut og hindrar myndun IgE og þeirra þátta sem stuðla að ofnæmi. Búið var til DNA bóluefni gegn hnetuofnæmi og það hjúpað með jákvætt hlöðnu lípíði (chitosan). Mýs sem fengu lípíð hjúpað DNA með ríkjandi hnetuvakageni (pCMVArah2) framleiddu IgA og IgG2a. Þegar ónæmissvar þessara músa var borið saman við ónæmissvar músa sem voru óbólusettar eða bólusettar með tómri DNA ferju, sást veruleg minnkun á vakaræstu ofnæmislosti sem tengdist minna magni af IgE og bólguboðefnum (Cui, 2005). DNA bóluefni til meðferðar gegn ofnæmi hefur gengið vel í músum (Weiss et al., 2006) en eins og með DNA bóluefni gegn smitsjúkdómum virðist erfitt að færa þennan góða árangur yfir á menn eða stærri dýr. Ofnæmi er ekki algengt vandamál í húsdýrum, einna helst þó í gæludýrum eins og hundum (Pedersen, 1999) og í hestum s.s. heymæði (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) (Eder et al., 2000; Schmallenbach et al., 1998) og sumarexem (Halldorsdottir et al., 1989; Marti et al., 1999). Af þessum sökum eru ekki stundaðar mjög víðtækar rannsóknir á þessu sviði.

1.4.1.4 Ónæmisörvandi CpG stef

DNA bóluæfni hafa innbyggða ónæmisglæða sem eru svokallaðar CpG raðir, en þær eru Th1 stýrandi. Sýnifrumur í ónæmiskerfi spendýra hafa lært að þekkja þessi CpG stef sem hættuboð eða merki um sýkil. CpG raðirnar bindast TLR9 í sýnifrumum og við það seyta þær út fjölda af boðefnum, þar á meðal IFN- α/β , TNF- α , IL-6 og IL-12 og þar með ræsast NK frumur til að framleiða IFN- γ en sum þessara boðefna (IL-12 og IFN- γ) beina Th núll frumunni á Th1 braut (Weiss et al., 2006). DNA bóluæfni eru því nánast undantekningarlaust Th1 bóluæfni, alla vega ef þau eru gefin með nál. Einnig hefur verið sýnt fram á að CpG geti ekki aðeins beint ónæmissvari inn á Th1 braut heldur getur það aukið IL-10 framleiðslu (sem er skammtaháð) sem veldur því að bæði Th1 og Th2 svar minnkar og þar með dregur úr ofnæmiseinkennum (Tsalik, 2005).

Ónæmisglæðirinn í DNA bóluæfnum sem ræsir sýnifrumurnar eru stuttar kirmisraðir eða stef (motifs) á tjáningarferjunni með ómetyleruðu CpG tvíkirni í miðju og sérstökum kirknum sitt hvoru megin. Erfðaefni bakteríu er ólíkt erfðaefni heilkjörnunga með tilliti til CpG stefja. Heilkjörnungar eru með færri CpG núkleótíð en bakteríur. CpG stef eru yfirleitt metyleruð á fimmtu staðsetningu á um 70% cytosine basa í heilkjörnungum, en ómetyleruð í bakteríum. Í genamengi hryggdýra eru basarnir sitthvoru megin við CpG ekki tilviljanarkenndir. Algengast er að basinn á undan CpG sé C en G basinn á eftir. Athygli vekur að ómetyleruð CpG stef eru ónæmisvekjandi ef röðin er almennt XCGY; X séu allir basar nema C; Y séu allir basar nema G, en þá fæst ekki sterkt ónæmissvar (Krieg, 2002).

Örvunin fer ekki einungis eftir CpG röðinni eða stefinu sjálfu heldur líka eftir kirknunum sitt hvoru megin við stefið, fjölda þeirra og gerð. CpG stef er úr einum til tveimur bösum fyrir ofan og neðan CpG núkleótíðin en það gefur möguleika á mjög mörgum basasamsetningum. Með því að rannsaka áhrif mismunandi samsettra CpG stefja á ónæmisfrumur úr músum og kanínum sást að hagkvæmast er ef stefið er purine-purine-CG-pyrimidine-pyrimidine og stefið sem virkaði best er GACGTT. Komið hefur í ljós að viss tegundasérvirkni er fyrir CpG stefjunum. Það eru t.d. ekki sömu CpG stefin sem virka best í músum og mönnum. Stefið sem virkar best í músum GACGTT örvar lítt manna hvítfrumur. Menn og mannapar svara hinsvegar kröftuglega á sama stefið, GTCGTT svo og ýmsar aðrar dýrategundir eins og nautgripir, kindur, geitur, kettir, hundar, svín, hæsni og hestar (Krieg, 2002).

Hægt er að prófa *in vitro* og *in vivo* hvort CpG raðirnar vekja ónæmissvar í dýrategundinni með því að búa til CpG margkiri (oligodeoxynucleotides, ODN). Ýmsir þættir hafa áhrif á getu CpG ODN til að ræsa og efla enn frekar ónæmissvar eins og hvernig basar eru fyrir ofan og neðan við CpG stefið, fjöldi og bil á milli CpG stefja og gerð grindar (backbone). Þó öflugustu ODN hafi yfirleitt tvö til þrjú CpG stef er ekki hægt að auka virknina frekar með því að bæta við fleiri stefjum. Til að koma í veg fyrir niðurbrot eru CpG ODN iðulega útbúin með breytttri nukleasa þolinni grind en þá er einu af ótengdu súrefnisatómum á hverri fosfódiester (phosphodiester, PO) tengingu skipt út fyrir brennisteinsatóm til að búa til fosfórothioate (phosphorothioate, PS) grind. CpG ODN á PS formi hefur mikla sækni í að bindast frumuhimnu og því hlutfallslega meira tekin upp af frumum (Krieg, 2002).

Gróflega er hægt að skipta CpG ODN upp í 2 megingerðir sem ræðst af gerð grindarinnar og frumnanna sem ræstast. ODN með PO grind hafa verið kallaðar CpG-A ODN og ræsa NK frumur og koma af stað IFN- α framleiðslu angafrumu (plasmacytoid DC) forvera. Áhrifamáttur ODNsins eykst enn frekar ef 5' og 3' endarnir eru PS breyttir, sem gerir ODN-ið nukleasaþolnara, en miðjan með PO grind. Með því að bæta röð af G bösum á 5' og 3' endana eykur það upptöku inn í frumur og þar með aukast líkurnar á því að ræsa NK frumur. CpG-B ODN eru á nukleasaþolnu PS formi, engar fjöl-G basaraðir og hafa áhrif á ónæmisörvun B frumna. Í raun er ekkert algilt í þessu og margar undantekningar og því ber að líta á hverja DNA sameind með CpG stefi sem sér orsakavald (Krieg, 2002).

Greint hefur verið frá DNA röðum sem innihalda CpG tvíkiri sem sporna við örvunaráhrifum CpG stefja. Þessi hamlandi stef innihalda raðir þar sem CpG nukleótíðin hafa cytosine 5' megin (CCG) eða tvo guanine 3' megin (CGGG). Tíðni hamlandi stefja er tvisvar til fimm sinnum algengara en CpG stef í genamengi mannsins sem gefur til kynna að þessi stef séu til að vinna gegn mögulegum ónæmisörvandi áhrifum CpG stefja innan genamengis hryggdýra (Sasaki et al., 2003).

Hagkvæmast væri að taka út sem flest hamlandi stef og setja inn CpG ónæmisvekjandi stef á ferju DNA bóluefnis til að auka ónæmissvarið. Jafnvel væri auðveldara að gefa CpG ODN með DNA bóluefninu til að auka ónæmissvarið heldur en að gera umbætur á ferjunni. Aftur á móti fékkst minni tjáning á vaka þegar CpG ODN var gefið með DNA bóluefnaferju með vaka sem má líklega rekja til samkeppni milli ferjunnar og ODN að komast inn í markfrumurnar (Babiuk et al., 2003; Sasaki et

al., 2003). Prófað hefur verið að eyða af ferju 52 af 134 hamlandi CpG stefjum og síðan bætt inn á hana auka CpG ónæmisvekjandi stefjum, 16 stef og fleiri.

Ónæmissvar þessara breyttu ferja var síðan borið saman við foreldraferjuna og sýndi ferjan með eyddum hamlandi stefjum aukin ónæmisörvandi áhrif við rannsóknir í músum og ferjan með auka 16 CpG stefjunum enn meiri áhrif. Aftur á móti gaf auka 50 CpG stef lægra mótefnasvar samanborið við auka 16 CpG stef, þrátt fyrir að hafa gefið besta CTL svarið. Verið gæti að of mörg viðbótar CpG stef í DNA bóluefni hafi þau áhrif að framleitt sé of mikið af interferonum af gerð I sem leiðir til að minna er tjáð af vaka ferjunnar og verður hún því minna ónæmisvekjandi. Vitað er að IFN- γ hamlar virkni veirustýrsla og því getur mikil IFN- γ framleiðsla dregið úr magni vaka sem tjáð er undir stjórn CMV stýrils (Krieg, 2002; Sasaki et al., 2003). Annars er hagkvæmasti fjöldi CpG stefja mismunandi milli dýrategunda en ónæmissvar í kúm jókst með fjölda CpG stefja allt upp í 160 stef á einni ferju (Babiuk et al., 2003).

Prófað hefur verið að setja auka CpG stef inn á bluescriptferju og gefa með HIV-1 DNA bóluefni. Sett voru 5, 10, 15 og 20 auka CpG stef inn á bluescript ferju og fékkst aukin tjáning á vefjaflokkasameind II, CD40 og CD86 *in vitro*. Með því að sprauta í mýs CpG ferjunnar með HIV-1 DNA ferjunni jókst marktækt HIV-sértækt mótefna- og frumubundna svarið. Marktækt hærra svar fékkst ef CpG ferjunnar voru gefnar 2 til 4 dögum eftir DNA bólusetninguna. Ferja sem innihélt 20 auka CpG stef gaf besta ónæmissvarið bæði *in vitro* og *in vivo*. Niðurstöðurnar gáfu til kynna að auka CpG stef á ferju gætu bætt ónæmissvar DNA bóluefnis (Kojima et al., 2002).

CpG ODN með próteinum hefur mikið verið notað til að ræsa Th1 ónæmissvar. Það hefur meira að segja verið sýnt fram á að með því að gefa CpG með var hægt að koma í veg fyrir Th2 miðlað viðbragð og jafnvel breyta Th2 svari nær því sem líkist Th1 svari í músum og í mönnum (Tsalik, 2005; Weiss et al., 2006).

Nokkrar rannsóknir benda til að það sé fleira en CpG á ferjunni sem örvi ónæmissvar en með því að bólusetja annars vegar með methyleraðri og hins vegar ómethyleraðri ferju fékkst svipað Th1 miðlað mótefna- og frumusvar. Einnig fékkst Th1 miðlað ónæmissvar eftir DNA bólusetningu bæði í TLR9 genasviptum músum og í villigerð. Það eru sem sagt til fleiri óþekkt hættuboð á DNA ferju en CpG stef (Weiss et al., 2006).

1.4.2 Ónæmisglæðar

Íslenska orðið fyrir adjuvant er ónæmisglæðir en adjuvant er komið af latneska orðinu adjuvare sem þýðir að hjálpa og er hægt að skilgreina sem efni (eða samsett efni) sem örvar eða stýrir ónæmissvari gegn vaka sem það er blandað við. Mismunandi vakar þurfa mismunandi hjálp frá glæðunum. Ónæmisglæðar vekja meðfædda ónæmissvarið og er hægt að flokka eftir fimm verkþáttum

- Ónæmisstýringu (immunomodulation, s.s. stýringu boðefnatjáningar og þá er átt við hvort ónæmissvarinu sé stýrt inn á Th1 eða Th2 braut).
- Sýningu (presentation, viðhaldi á lögun vakans).
- T drápsfrumu ónæmiskynningu (lýsir því ferli sem fer af stað þegar vaki binst T frumu viðtaka í fyrsta skipti og ónæmissvar hefst).
- Hvort ræsa eigi ákveðna markfrumu (targeting specific cells).
- Forðamyndun (depot generation, sem má útskýra sem svo hve lengi vakanum er haldið á staðnum, varðveittur).

Ónæmisglæðir getur virkað á fleiri en einn máta til að vekja varnar ónæmissvar gegn vaka þ.e. hann getur séð um fleiri en einn af þessum verkþáttum. Samsetning eins eða fleiri ónæmisglæða og vaka hefur verið mikið rannsakað á undanförunum árum (Lima et al., 2004).

Bóluefni sem er verið að þróa nú á tímum byggist á notkun einangraðra endurraðaðra eða nýmyndaðra vaka en vandamálið við þá er að það fæst minni ónæmissvörun miðað við bóluefni með lifandi eða dauðum heilum lífverum. Það kallar á notkun öflugra ónæmisglæða. Alum (Aluminium hydroxid) sem hefur lengi verið ráðandi glæðir í mannabóluefnum vekur gott mótefnasvar (Th2) en örvar ekki frumubundið ónæmissvar (Th1) sem er mikilvægt sem varnarsvar gegn t.d. innanfrumu sýklum. Það er þörf á öruggum ónæmisglæðum sem örva frumubundið ónæmissvar (Th1) og hægt er að nota í bóluefni sem gefin eru í gegnum slímhúð, í DNA bóluefni, ofnæmis, krabbameins og sjálfsofnæmis bóluefni (Petrovsky and Aguilar, 2004).

Rannsóknaniðurstöður um meðfædda ónæmiskerfið og þá sérstaklega um PAMP sameindir og PRR viðtaka s.s. TLR og fleiri hafa valdið umbyltingu í ónæmisglæða rannsóknum á undanförunum árum (Marciani, 2003).

1.4.3 Ónæmisstýrandi glæðar

Enn sem komið er eru ekki margir fullbúnir Th1 ónæmisglæðar á markaðnum sem leyfðir eru í bóluefni (clinical grade). Með aukinni þekkingu á verkun ónæmisglæða og viðtökum þeirra s.s. TLR, þá stendur þetta til bóta. Mörg efnasambönd úr bakteríum hafa sýnt fram á að vera mjög ónæmisörvandi en samt sem áður eru flest þessi efnasambönd frekar eitruð. Til að leysa þann vanda hefur miklu þúðri verið eytt í að finna og einangra þá þætti sem hafa ónæmisörvandi áhrif án eitur áhrifa. Nokkur efnasambönd hafa fundist sem verið er að prófa sem ónæmisglæða. Eitt þessara efnasambanda er lipíð A úr lipopolysaccaride og er mjög ónæmisvekjandi og annað efnasamband er muramyl dipeptíð (MDP) (Johansson et al., 2004). Einnig hefur verið sýnt fram á að viss peptíð s.s. poly-L-arginín geta virkað sem Th1 glæðar ein sér eða með CpG röðum (Lingnau et al., 2002).

1.4.3.1 Monophosphoryl-lipid A, MPL

Monophosphoryl-lipid A (MPL) er tilbúinn blandaður oliuglæðir sem innheldur afeitrað lipíð A úr lípópólísakkariði (LPS) *Salmonella minnesota* R595. MPL er Th1 stýrandi glæðir bæði í músum og mönnum (Baldrige and Crane, 1999; Evans et al., 2003). Lipid A er byggingarþáttur úr lipopolysaccaride (LPS) sem er staðsett í ytra fitulagi frumuveggs Gram-neikvæðra baktería. Sýnt var fram á að eitur- og ónæmisglæðaáhrif LPS séu vegna lipid A hlutans. Með því að fjarlægja fosfat hóp af sykur hlutanum minnkuðu eitur áhrifin 100-1000 falt en samt sem áður hélst ónæmisörvandi hlutinn í sameindinni (Evans et al., 2003; Johansson et al., 2004).

LPS og þá einnig MPL bindast TLR4 og TLR2 viðtökunum (Chodaczek et al., 2006; Johansen et al., 2005; Martin et al., 2003). Boð í gegnum TLR4 kemur af stað ferli í sýnifrumunni þar sem hjálparboðsameindir, frumuyfirborðsviðtakar, boðefni og bólguboð eru tjáð. MPL ónæmisglæðir miðlar frumubundnu ónæmi og ýtir undir Th1 ónæmissvar (aukin IFN- γ framleiðsla) sem gerir MPL ónæmisglæðirinn tilvalinn fyrir ofnæmisbóluefni (Evans et al., 2003). MPL getur einnig tengst TLR2 viðtaka sem líklega leiðir til ræsingar á Treg frumum (Wheeler, 2006). Rannsókn á einkjörnungum (monocytes) úr mönnum sem örvaðar voru með MPL sýndi að MPL notaði TLR2 og TLR4 á mismunandi hátt til að hvetja TNF- α , IL-10 og IL-12 framleiðslu sem gefur til kynna að MPL geti örvað Th1 og Th2 boðefni í gegnum TLR. Einnig var sýnt fram á að TLR2 og TLR4 stuðluðu að tjáningu CD86 og sérstakelga CD80 í manna einkjörnungum sem örvaðar voru með MPL (Martin et al., 2003).

Hægt er að nota MPL til að efla ofnæmisbóluefni sem notuð eru í fólk, þannig að ef MPL gæti örvað Th1 svar í hrossum væri hægt að nota hann í próteinbóluefni og/eða til að efla svar eftir DNA bólusetningu (Cramer and Rhyner, 2006; Evans et al., 2003; Wheeler, 2006).

1.4.3.2 Muramyldipeptide, MDP

Muramyldipeptide (MDP, N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine) er lítið fjölsykrupeptíð (glycopeptid) úr frumuvegg bakteríunnar *Mycobacterium* sem notuð er í complete Freund's adjuvant (CFA). Það hefur verið sýnt fram á að MDP eykur ekki aðeins mátt veiks vaka heldur eflir ósérvirka vörn gegn fjölbreytilegum örverusýklum eins og við bakteríu, sveppa og veirussýkingu (Johansson et al., 2004; Masihi, 2000).

Ónæmisglæðaáhrif MDP eru háð því við hvað það er blandað en í saltlausn hvetur það mótefnaháð ónæmi en sett í fitukorn (liposomes) eða blönduð við glýseról kemur það af stað sterku frumubundnu ónæmi. Frumurnar sem MDP örva eru meðal annars stórátfrumur, hvítfrumur, mastfruma, innþekjufrumur og trefjakímfrumur (Petrovsky and Aguilar, 2004). MDP er skilgreint sem PAMP og binst innanfrumu-PRR viðtaka sem kallast “nucleotide-binding oligomerisation domain protein 2” (NOD2). Ferlið sem fer af stað eftir bindingu við vakann leiðir til kaspasa örvunar (caspase activation), frumudauða (apoptosis), framleiðslu frumbólgu boðefna (TNF- α og IL-1 β), einnig boðefna og hjálparboðsameinda (t.d. IL-6, IL-12, B7.2) sem eiga þátt í frumubundnu ónæmi (Moschos et al., 2006).

1.4.3.3 Poly-L-arginine, pR

Jákvætt hlaðnar fjöl-aminósýrur (cationic poly-amino acids), þar með taldar poly-L-arginine (pR) og poly-L-lysine (pK) örva sýnifrumur (APC) til að taka upp peptíðvaka *in vitro* og *in vivo*. Sýnt hefur verið fram á að pR getur virkað sem Th1 glæðir einn sér eða með CpG röðum. Jákvæð hleðsla pR og neikvæð hleðsla CpG-ODN virka vel saman og hafa ónæmisstýrandi áhrif. Rannsókn sýndi að pR/CpG-ODN blanda hefði mun meiri ónæmisáhrif en efnin ein og sér. Ónæmissvarið sem fékkst með blöndunni varði marktækt lengur en þau sem fengust með CpG-ODN eða pR eitt og sér. Þar að auki kom pR í veg fyrir að CpG-ODN kæmi af stað kerfisbundnum losunum á frumbólgu boðefnum eins og TNF- α og IL-6. Þetta tvennt má líklegast rekja til pR-miðlandi varðveislu (depot formation) á sprautunarstað. Niðurstöður

sýndu að bóluefni með peptíð og pR/CpG-ODN blöndu væri árangursrík og örugg aðferð til að fá ónæmiskynningu sem væri öflug og endingargóð peptíð-sértæk T frumu svörun. Í nokkrum tilraunum með DNA bólusetningu voru jákvætt hlaðnar fjöl-aminósýrur notaðar sem hæfir flutningsberar fyrir plasmíð DNA inn í frumurnar (Lingnau et al., 2002). Einnig hefur verið sýnt fram á að pR geti flutt peptíð og prótein inn í frumur (Deshayes et al., 2005; Luhrs et al., 2002; Mattner et al., 2002; Noguchi and Matsumoto, 2006)

Uptaka poly-L-arginine byggist á innfrumun (endocytic process) (Luhrs et al., 2002). pR binst heparín súlfíð á yfirborði frumu og innhverfist með hjálp heparín súlfíð-sértæks innfrumunarferils. Þegar inn í frumuna er komið losnar pR frá heparín súlfíðinu sem veldur því að himna innfrumunarblöðrunar byrjar að leka og peptíðin losna inn í umfrymið (Deshayes et al., 2005).

1.5 Staða verkefnisins

Á Keldum hefur verið sett upp líkan í hestum þar sem notað er "human serum albumin" (HSA) gen og prótein. Ofnæmi var myndað gegn HSA í fjórum hestum með því að sprauta þá með HSA og alum ónæmisglæði undir húð. Þessir hestar svara á HSA með meira IL-4 en IFN- γ , IgE og sterku IgG(T) og eru jákvæðir í húðprófi. Ónæmissvar þeirra er notað til að bera saman við ónæmissvar hesta sem bólusettir hafa verið og verða bólusettir með HSA geninu á tjáningarferjum. Tvær tjáningarferjur með HSA geninu hafa nú þegar verið prófaðar í hrossum. Sprautaðir voru 2 hestar í vöðva og í húð með hvorri ferju.

Jarpur og Litfari voru sprautaðir með HSA geni á pcDNA3.1/GS genaferju í vöðva og undir húð ellefu sinnum með nokkurra vikna millibili. Eftir DNA bólusetningu svöruðu þeir HSA með lágu IgG mótefnasvari en ekki IgE. Hestunum var ógrað með HSA próteini og alum þrisvar sinnum undir húð. Eftir það svöruðu þeir með öflugu IgG(T) og IgE mótefnum. Þeir svöruðu á HSA í húðprófi.

Erpur og Rökkvi voru sprautaðir með HSA geni á pcDNA3.1/V5-His genaferju í vöðva og undir húð átta sinnum með nokkurra vikna millibili. Annar svaraði HSA með örilitlu IgG mótefnasvari en hinn ekkert. Þeim var gefin HSA prótínefling þrisvar sinnum. Eftir það svöruðu báðir með IgG(T) og IgE og svöruðu báðir á HSA í húðprófi.

Þessi lágu svör virtust ekki nægilega Th1 miðuð (fókuseruð) fyrir eflingu svars með prótíni. Mótefnasvar var mjög lágt eftir ítrekaðar bólusetningar. Eftir próteineflingu í kjölfar DNA bólusetninganna var IgG undirflokkasvörun hestanna með svipuðu sniði og hjá samanburðahestum með ofnæmi. Greinilegt er að eitthvað þarf að gera til að efla svarið. Það lá því fyrir að bæta þyrfti tjáningarferjurnar. pcDNA3.1 ferjurnar hafa verið prófaðar í hestafrumum *in vitro* og eru ekki mjög vel tjáðar en aftur á móti er önnur ferja sem kallast VR1012 með sýnigeni (CAT), sem líka var prófuð, mun betur tjáð. VR1012 er hins vegar erfð í notkun þar sem ekki liggja fyrir nægar upplýsingar um uppruna hennar og basaröð. Líklegt er að VR1012 sé betur tjáð í hestafrumum vegna þess að hún hefur innröð aftan við stýriröðina (promoter). En algennt er að slíkri innröð sé bætt inn á ferjur sem verið er að nota í DNA bólusetningartilraunum (Ertl and Thomsen, 2003).

Að framansögðu þótti ástæða til að reyna að bæta tjáningu ferjanna í hestafrumum og leita að ónæmisglæði til að Th1 stýra ónæmissvari í hestum.

TILGANGUR TILRAUNA

Markmið verkefnisins var að þróa og prófa tjáningarferjur fyrir DNA bóluefni og ónæmisglæða sem örva Th1 ónæmissvar hjá hestum.

Farnar voru mismunandi leiðir að markmiðinu:

- 1) Þróaðar og prófaðar voru tjáningarferjur sem hægt væri að nota í DNA bóluefni fyrir hross.
- 2) Leitað að CpG röðum sem örva ónæmissvörun í hestum og nota mætti sem ónæmisglæði á tjáningarferjum eða í próteinbóluefni.
- 3) Prófuð stutt peptíð sem gætu virkað sem Th1 glæðar einir og sér eða gætu eflt svörun með CpG stefjum.
- 4) Prófaður *in vivo* Monophosphoryl-lipid A (MPL) tilbúinn Th1 stýrandi ónæmisglæðir.

Til að geta metið hvort að ónæmissvar væri á Th1 braut eða Th2 braut var sett upp rauntíma PCR TaqMan aðferð til mælingar á boðefnum. Sem Th1 viðmið var notuð ónæmissvörun hesta við γ -herpesveiru.

EFNI OG AÐFERÐIR

3.1 Hestar

Sex heilbrigðir íslenskir hestar (5-9 vetra) voru notaðir í tilraunina, Bjössi, Kalli, Dvergur, Svarthöfði, Jakob og Svali. Upplýsingar um hestana, í hvaða tilraunir þeir voru notaðir og hvenær tilraunirnar fóru fram, kemur fram í töflu 1.

Tafla 1 Tilraunahestar

Nafn	Fæðingarár	Tímabil tilrauna	Uppruni	Bólusetning
Bjössi	1997	Sept '03-des '06	Skagafjörður	HSA prótein og alum glæðir
Kalli	1997	Sept '03- des '06	Hornafjörður	HSA prótein og alum glæðir
Dvergur	1998	Feb '04-mai '06	Rangárvellir	HSA prótein og MPL glæðir
Svarthöfði	1996	Feb '04-júlí '05	Rangárvellir	HSA prótein og MPL glæðir
Jakob	1998	Feb '05-des '06	Rangárvellir	HSA prótein og MPL glæðir
Svali	1999	Feb '05-des '06	Rangárvellir	HSA prótein og MPL glæðir

3.1.1 Bólusetningar og blóðtökur

Bólusetning með HSA próteini í alum glæði: Human serum albumin (HSA) próteini (Sigma) var sprautað undir húð (subcutaneous) á einum stað á hálssvæði hestanna í lausninni 89,5 µg í 0,25 ml phosphate buffer saline (PBS) blandað í 0,25 ml hydroxid alum (Alhydrogel® Superfos biosector). Notuð var 21 gauge nál (Terumo®).

Bólusetning með HSA próteini í MPL glæði: 89,5 µg HSA blandað í 250 µl PBS. 500 µl HSA (179 µg) og 1,5 ml PBS blandað í einn skammt af MPL ónæmisglæðinum (Sigma). Heildarrúmmálið var því 2 ml í hvern hest. Einn MPL skammtur miðast við eitt glas sem inniheldur 0.5 mg monophosphoryl lipid A úr *S. minnesota* (MPL), 0.5 mg trehalose dicorynomycolate (TDM) og 0.5 mg frumuvegg úr berklabakteríum (cell wall skeleton frá tubercule bacillus, CWS) í 2% olíu-Tween 80-vatni. Fyrir aðra og þriðju bólusetningu var blandað 1 ml af HSA (358 µg/ml) og 1 ml PBS í einn skammt af MPL ónæmisglæði. Skammtur í hvern hest var 1 ml, 179 µg/ml HSA og hálfur skammtur af MPL. Hestarnir voru sprautaðir einu sinni undir húð og einu sinni í vöðva (intra muscular) báðum megin á hálsinum (tvær stungur hvoru megin). Notuð var 21 gauge nál (Terumo®).

Ofnæmishúðpróf voru framkvæmd með því að sprauta 0,5 ml af 1% HSA-lausun (50 mg HSA blandað með 5 ml sterílu PBS) í húð. Viðmiðunarsýni voru Histamín 1 mg/ml í PBS (jákvætt) og PBS (neikvætt). Sprautað með 0,5 ml á hvern stað, hverri

lausn einu sinni hvoru megin á hállssvæði hest. Húðsvæðið var klippt/rakað áður. Notuð var 25 gauge nál (Terumo®).

Blóð var tekið úr bláæð á hálsi (vena jugularis). Notuð var Vacuette nál af stærð 20Gx1½” (0,9mmx38mm, Greiner bio-one, Austria). Blóð var tekið í blóðtökuglós með Lithium Heparin storkuvara (Vacuette® Greiner) ef einangra átti hvítfrumur en sermisglös (Vacuette® Greiner) ef hirða átti sermi.

Bjössi og Kalli voru notaðir sem samanburðarhestar, framkallað var ofnæmi í þeim með því að sprauta þá með HSA próteini í alum ónæmisglæði undir húð einu sinni (sjá blóðtökur og aðgerðir í viðauka A) og gert á þeim húðpróf.

Dvergur, Svarthöfði, Jakob og Svali voru sprautaðir með HSA próteini í MPL ónæmisskýrandi glæði þrisvar sinnum (sjá blóðtökur og aðgerðir í viðauka A).

3.2 DNA-vinna

3.2.1 Skerðiensím

Skerðiensím voru notuð til að staðfesta hvort að um ætlað erfðaeftni væri að ræða og til að klóna í eða úr ferju. Skerðiensímin, Bovine Serum Albumin (BSA) og viðeigandi dúar voru frá New England Biolabs og Fermentas og var farið eftir þeirra leiðbeiningum. Í hvarfblöndu var notað ýmist eitt eða tvö skerðiensím, DNA sem átti að klippa, dúar, BSA ef þurfti og að lokum ddH₂O upp að lokarúmmáli. Hvörfin voru látin ganga í 2-18 klst. við 37°C og ensímin síðan afvirkjuð með því að hita lausnina í 65-80°C í 20 mín. og fór það eftir því hvaða ensím átti í hlut.

3.2.2 Límingar

T4 DNA lígasi var notaður til að líma erfðaeftni saman, þá einna helst erfðaeftni inn í ferju. Lígasinn og 10x dúinn voru frá Fermentas og fylgt leiðbeiningum frá þeim við límingar. Styrkur erfðaeftnis og ferju var mældur í ljósmæli eða áætlaður á rafdráttar hlaupi. Miðað var við að hlutfall milli erfðaeftnis og ferju væri u.þ.b. 6:1 sameindir. Límt var í 10 µl rúmmáli í 12-24 klst. við 16°C og lígasinn síðan afvirkjaður við 65°C í um 15 mín.

Í nokkrum tilraunum var TOPO cloning kit frá Invitrogen notað en í því er línuleg ferja (pCR2,1-TOPO vector) með Topoisomerasa á endunum sem hjálpa til við að líma erfðaeftni inn í ferjuna. Taq polymerasi skilur eftir óparaðan A basa á

endum PCR afurða, samloðunarenda (overhang) sem fellur að T basanum sem er óparaður á endum TOPO ferjunnar. Farið var eftir leiðbeiningum frá framleiðanda fyrir utan að notast var við helmingi minna magn af TOPO ferjunni.

3.2.3 Magnmæling DNA

Styrkur erfðaeftnis var áætlaður í rafdrætti á agarósahlaupi (útskýrt nánar hér að neðan) eða með mælingu í ljósmæli. BRL DNA stigi frá Life Technologies var notaður sem viðmið í rafdrætti en band af stærðinni 1.635 bp er 10 ng/μl. Til að mæla styrk erfðaeftnis voru sýni þynnt og sett í ljósmælinn GeneQuant Pro RNA/DNA calculator frá Amersham Biosciences samkvæmt leiðbeiningum frá framleiðanda. Yfirleitt voru sýnin þynnt 1:10 til 1:50 í 10 μl ddH₂O, sett í 5mm ultramicro quartz kúvettu og ljósgleypnin mæld við 260 nm og 280 nm.

3.2.4 PCR

Keðjuverkandi fjölliðun (polymerase chain reaction, PCR) var notuð við hina ýmsu þætti rannsóknarinnar. PCR aðferðin byggist á því að nota mismunandi hitastig við skrefin þrjú í hvarfinu, þ.e. eðlissvipting erfðaeftnis (denaturation), tenging vísa (annealing) og lenging (extension). Þessi þrjú skref eru endurtekin 25-40 sinnum til að fá nógu mikla mögnun af erfðabútnum sem er á milli vísanna.

Vísarnir sem voru notaðir í PCR hvörfin voru ýmist hannaðir eftir þekktum röðum erfðaeftnisins sem átti að magna upp eða notaðir þekktir vísar sem basaparast við raðir á ferjunni sem voru í notkun hverju sinni (sjá töflu 2). Vísarnir voru pantaðir frá TAG Copenhagen.

PCR var framkvæmt á ferjum með mismunandi erfðaeftnisbútnum (t.d. boðefni úr hestum, HSA gen eða CpG raðir) eða erfðaeftni einangrað úr frumuræktum. Þegar athuga þurfti hvort að ætlað erfðaeftni væri í bakteríuþyrpingum var pikkað í þær og þær leystar upp í ddH₂O dropa og síðan voru notaðir 3 μl úr dropanum í PCR hvarfið.

PCR hvarfið var annað hvort gert með Dynazyme polymerasa (Finnzymes) eða Taq polymerasa (Amersham) samkvæmt staðlaðri aðferð. PCR grunnblandan gat verið frá 10-50 μl en yfirleitt var blandan 20 μl.

Einnig var framkvæmt magnbundið rauntíma-PCR (quantitative real time RT-PCR) en það verður útskýrt í kafla 3.4.10.

Tafla 2 PCR og raðgreininga vísar.

Nafn vísis	Basaröð
Eq_TNFa_HindIII_F	GTATCGATAAGCTTGCATGAGCATTGAAAGCATG
Eq_TNFa_XbaI_R	GTATCGATTCTAGAGCTCACAGGGCAATGATCC
Eq_TNFa_1F	ATGAGCACTGAAAGCATGATCC
Eq_TNFa_705R	TCACAGGGCAATGATCCCAA
Eq_TNFa_12F	AAGCATGATCCGAGATGTGG
Eq_TNFa_700R	GGGCAATGATCCCAAAGTAG
EqTNFa_HindIII_12F	GTATCGATAAGCTTGAAGCATGATCCGAGATGTGG
EqTNFa_XbaI_700R	GTATCGATTCTAGAGCGGGCAATGATCCCAAAGTAG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
NEB1233	AGCGGATAACAATTTCCACACAGGA
M13 forward	GTTTTCCAGTCACGAC
M13 reverse	CAGGAAACAGCTATGAC
semiBGH_rev	GCAACTAGAAGGCACAGTCGA
VR1012_1	GCTCGGATGTGGAAGCTC
VR1012_2	GGCGGTACTTACGTCACCTTTG
VR1012_3	GCCAAGTAGGAAAGTCCCATAAG
VR1012_4	TTGGACATGAGCCAATATAAATG
VR1012MfeI_F	GGTGTCAATTGCTGCGGCATCAGAGCAGATT
VR1012NheI_R	GGTGCCTAGCGGTAACAGATGGCTGGCAACTAG
VR1012MfeI_2F	GGTGTCAATTGCTGCGGCATCAGAGCAGATT
CMV/txt-fp	GGTGTCAATTGTTTCGCGATGTACGGGCCAGATATA
CMV/txt-2rp	GGTGTCAAGCTTGGGTAACAGATGGCTGGCAACTAG
CMV/txt-rp	GGTGTCAAGCTTGGGTAACAGATGGCTGGCAACTAG
HSA-rp2	GGTGTCTCGAGGTAAGCCTAAGGCAGCTTGA
Eq-beta_F140	GTCGACGGTATCGATAAGCTTTGGGCCAGAAGGACTCATA
Eq-beta_F1.b	GTCGACGGTATCGATAAGCTTATGGATGATGATATCGCC
Eq-beta_F612	GTCGACGGTATCGATAAGCTTGAGAGGGAAATCGTGCCTG
VR1012_HindIII_F	CAGTTAAGCTTCGACAGCTCGTTTAGTGA
VR1012_BamHI_R	CAGTTGGATCCAGTGTGACGACCGGTGAC
VR1012_IA_F	GCTCGTTTAGTGAACCGTCAG
VR1012_IA_R	GACGACGGTGACTGCAGAA
WIZHSA-KasI_For	GGTGTGGCGCCTTATGAAGTGGGTAACCTTTAT
WIZHSA-BamHI_Rev	CGCTAGGATCCAATCAATGGTGATGGTGATGATG
WIZHSA-NotI_For	GGTATGCGGCCGCTTATGAAGTGGGTAACCTTTAT
WIZHSA-NotI2_For	GTATGCGGCCGCCACCATGAAGTGGGTAACCTTTAT
WIZHSA_1_FOR	GCGCCACCAGACATAATAGC
WIZHSA_1_Rev	AAAGGCAATCAACACCAAGG
WIZHSA_5_FOR	CCCAAGTGTCAACTCCAATC
WIZHSA_5_REV	CTCCTTATCGTCAGCCTTGC
WIZHSA_6_FOR	GTGAAACACAAGCCCAAGG
WIZHSA_6_REV	GATGGCTGGCAACTAGAAGG
HSA-fp1	GGTGTGAATTCCATGAAGTGGGTAACCTTTAT
HSA-rp1	GGTGTCTCGAGCGTAAGCCTAAGGCAGCTTGA

PCR grunnblanda	Dynazyme	Taq
DNA mót	breytilegt	breytilegt
dNTP blanda (2 mM)	2 µl	2 µl
10x PCR buffer	2 µl	2 µl
Vísir fyrir plúsbátt (20µM)	1 µl	1 µl
Vísir fyrir mínusbátt (20 µM)	1 µl	1 µl
Dynazyme polymerase	0,25 µl	
Taq polymerase		0,1 µl
ddH ₂ O fyllt upp að 20 µl		

PCR hvarf

1. Eðlissvipting erfðæfnis	95°C	2-5 mín.
2. Eðlissvipting erfðæfnis	94°C	30 sek.
3. Tenging vísa	48-60°C	30 sek.
4. Lenging	72 °C	30-90 sek.
Skref 2-4 voru endurtekin 25-40 sinnum		
5. Lenging	72 °C	7-10 mín.

Hitastigið í skrefi 3 fór eftir bræðslumarki vísanna.

Tíminn í skrefi 4 fór eftir stærð bútsins sem að átti að magna upp, gert ráð fyrir 30 sek. fyrir hverja 500 basa sem að voru eftirmyndaðir.

PCR tækin sem notuð voru: DNA Engine® Peltier Thermal Cyclers (PTC-200) frá MJ Research; GeneAmp® PCR System 9700 frá Applied Biosystems; Mastercycler gradient frá eppendorf.

3.2.5 Rafdráttur

Notaður var rafdráttur í agarósaflaupi til að skoða erfðæfni t.d. eftir einangrun erfðæfnis, PCR, klippingu og límingu. SeaKem®LE Agarósi frá Cambrex, ethidium brómíði og 0,5x TBE dúi (0,045 M Tris bórat og 0,00 1M EDTA, pH 8) voru notuð til að búa til hlaupið og rafdrátturinn fór fram í 0,5x TBE dúna við 75-85 V. Búin voru til 0,8-1% hlaup fyrir stærri búta og 1,5-2% hlaup fyrir minni búta. Agarósinn var bræddur í dúnanum og síðan ethidium brómíð bætt út í til að gera erfðæfnið sýnilegt. Til að þýngja og lita sýni fyrir hleðslu á hlaupið var 10x restriction stop buffer (10x RSB, 50% glyseról, 15 mM EDTA og 0,25% bromóphenól blár) notaður. BRL DNA stigi var notaður sem stærðarviðmið. Rafdregið erfðæfni var skoðað undir útfjólubláu ljósi í White/UV Transilluminator (UVP), mynd tekin og unnið með í Grab-IT forriti og prentað út í Digital Graphic Printer (UP-D860E) frá Sony.

3.2.6 DNA einangrun úr hlaupi

Til að einangra erfðæfni úr agarósa hlaupi var það skorið út undir útfjólubláu ljósi og var einangrað með QIAEX® setti frá QIAGEN samkvæmt leiðbeiningum. Í stuttu máli var hlaupið brætt við 50°C í 10 mín. og DNA leyft að bindast við kísilhlaupagnir í háum saltstyrk. Lausnin spuninn niður, flotið tekið af og agnirnar þvegnar í háum etanól styrk til að losna við saltið. Síðan var DNA losað af ögnunum með EB (QIAGEN).

Einu sinni var notað Montage PCR Purification sett frá Millipore til að hreinsa PCR afurð og var farið eftir leiðbeiningum frá þeim.

3.2.7 Raðgreining

Raðgreining var notuð til staðfestingar á að um rétt erfðaeefni væri að ræða, sjá breytingar á erfðaeefni og til að greina hver basaröð erfðaefnis væri. Notað var BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit í raðgreiningarhvarfið og sett í ABI 310 raðgreininna til greiningar samkvæmt leiðbeiningum frá framleiðanda (bæði frá Applied Biosystems). ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer raðgreinirinn er sjálfvirkur með eina hárfípú sem greinir bæði raðgreiningu og erfðamörk.

<u>Raðgreiningarhvarfblanda</u>	<u>PCR hvarf í MJR tækinu</u>
1 µl BigDye (v3.1)	1. Eðlissvipting erfðaefnis 96°C 1 mín.
1,5 µl Buffer (5x) úr settinu	2. Eðlissvipting erfðaefnis 96°C 10 sek.
1.6 µl 1-2 µM vísir	3. Tenging vísa ~55°C 5 sek.
x µl DNA mót (200 – 400 µg)	4. Lenging 60°C 2 mín.
x µl ddH ₂ O upp í 10 µl	Skref 2-4 eru endurtekin 29 sinnum (hringir).

Eftir raðgreiningarhvarfið var afurðin annars vegar hreinsuð með ísóprópanól fellingunni (a) eða með natríum acetate (b).

a) Út í hvarfblönduna var bætt 80 µl af 75% ísóprópanóli og blandað. Látið standa í 15 mín. við herbergishita til að fella út DNA. Spunnið í 20-30 mín. á 14.000 rpm í Eppendorf skilvindu. Flot tekið af og botnfall þvegið með 100-200 µl 70-75% ísóprópanóli og blandað. Spunnið í 5-10 mín. á 14.000 rpm. Flot tekið af og botnfall þurrkað og leyst upp með 15 µl TSR (Template Suppression Reagent, Applied Biosystems). Stundum var blandað, spunnið stutt niður og sýnið hitað í 95°C í 2 mín. Viðeigandi gúmítappi settur á tilraunaglasíð áður en það var sett í ABI 310 raðgreiningartækið.

b) Út í hvarfblönduna var bætt 2 µl 3M NaOAc (natríum acetate, CH₃COONa, pH 4,8) og 50 µl 95% etanól, blandað og haft í 20 mín. við herbergishita. Spunnið í 20 mín. á 14.000 rpm. Flot tekið af og botnfall þvegið með 250 µl 70% etanóli. Spunnið í 5-10 mín. og flot pípeterað af og botnfall þurrkað í 1 mín. við 90°C. Botnfall leyst upp í 20 µl TSR, blandað og spunnið stutt niður og sýnið hitað í 95°C í 2 mín. áður en það var sett í ABI 310 raðgreiningartækið.

Raðgreiningar skoðaðar í Sequencer™ forriti frá Gene Codes Corporation.

3.2.8 Innskot og plasmíð

Tjáningarferjur með HSA geni

Uppruna ferja og afbrigði þeirra má sjá í töflu nr 3 og 4 og myndir af þeim í viðauka B.

Tafla 3. Tjáningaferjur.

		Uppruni	Stærð	Fúkalyf ¹	Intron A	Kozak ²
pcDNA3.1/GS		pcDNA3.1	4,0	zeo		
pcDNA3.1/GS+HSA	G		5,8	zeo		partur
pcDNA3.1/V5-His		pcDNA3.1	5,5	amp/zeo		
pcDNA3.1/V5-His+HSA	H1		7,3	amp/zeo		partur
pcDNA3.1/V5-His/1A+HSA	H2		8,3	amp/zeo	Intron A	partur
gWIZ		pUC18	5,1	kan	Intron A	
gWIZ+HSA/V5-His	W1		7,0	kan	Intron A	
gWIZ+HSA/V5-His+K	W2		7,0	kan	Intron A	Kozak
VR1012		pUC18	4,9	kan	Intron A	
VR1012+HSA/V5-His	V1		6,9	kan	Intron A	
VR1012+HSA/V5-His+K	V2		6,9	kan	Intron A	Kozak

1) Zeo: zeocin, amp: ampicillin, neo: neomycin, kan: kanamycin.

2) Kozak raðir: pcDNA3.1/GS+HSA hefur CACCATG; pcDNA3.1/V5-His+HSA hefur CCATG og gWIZ og VR1012 með Kozak röð hafa GCCACCATG röðina.

Tafla 4. Innskot í tjáningarferjur.

		Innskot	Einangrun
pcDNA3.1/V5-His+HSA	H1	HSA frá pcDNA3.1/GS	EcoRI, XhoI
pcDNA3.1/V5-His/1A+HSA	H2	CMV Intron A frá VR1012	BamHI, HindIII
gWIZ+HSA/V5-His	W1	HSA gen og V5-His6 tag frá pcDNA3.1/V5-His	BamHI, NotI
gWIZ+HSA/V5-His+K	W2	Kozak og HSA gen og V5-His6 tag frá pcDNA3.1/V5-His	BamHI, NotI
VR1012+HSA/V5-His	V1	HSA gen og V5-His6 tag frá pcDNA3.1/V5-His	BamHI, NotI
VR1012+HSA/V5-His+K	V2	Kozak og HSA gen og V5-His6 tag frá pcDNA3.1/V5-His	BamHI, NotI

G og H1

Búið var að gera pcDNA3.1/GS+HSA (G) og pcDNA3.1/V5-His+HSA (H1) ferjurnar og nota í DNA bólusetningu í hestum. HSA genið var magnað upp með PCR af ferjunni pcDNA3.1/GS+HSA (Invitrogen), hreinsað á agarósa hlaupi, klippt með EcoRI og XhoI, hreinsað og límt með T4 DNA lígasa inn í pcDNA3.1/V5-His sem einnig hafði verið klippt með sömu ensímunum og hreinsað. HSA genið var magnað upp með vísunum HSA-fp1 og HSA-rp1 og klónað inn í fasa við V5 vakaeiningu (epitope) og polyhistidine tag. Báðar tjáningaferjurnar raðgreindar á 5' og 3' svæði HSA gens inn á ferju með T7, semiBGH-rev, WIZHSA-1-Rev og WIZHSA-6-For.

H2

CMV stýrillinn og intron A á VR1012 ferjunni var raðgreint með CMV/txt-rp, VR1012-1, VR1012-2, VR1012-3 og VR1012-4. CMV intron A var magnað upp með

PCR af VR1012, hreinsað, klippt með BamHI og HindIII, hreinsað og límt inn í H1 ferjuna milli stýrilsins og HSA gensins til að búa til ferjuna pcDNA3.1/V5-His/IA+HSA (H2). H1 ferjan var klippt með BamHI og HindIII og hreinsuð á agarósa hlaupi. Intron A röðin var mögnuð upp með vísunum VR1012-HindIII-F og VR1012-BamHI-R. Rétt stærð á innskoti var staðfest með PCR með vísunum VR1012-IA-F og R, VR1012 haft sem viðmið og með HindIII og XhoI skerðiensímunum, H1 ferjan höfð sem viðmið. Einnig var innskotið raðgreint yfir samskeyti ferju og innskots með VR1012-1, VR1012-2 og WIZHSA-1-Rev og raðgreint á 5' og 3' svæði HSA gens inn á ferju með semiBGH-rev, WIZHSA-1-Rev og WIZHSA-6-For til frekari staðfestingar.

W1, W2, V1 og V2

HSA genið, V5 vakaeiningin og 6XHis tag voru mögnuð upp með PCR frá H1 ferjunni, hreinsað, klippt með BamHI og NotI, hreinsað og límt inn í VR1012 og gWIZ (Gene Therapy Systems, Inc.) plasmíð með eða án Kozak raðar. Kozak röðin GCCACCATG var innlimuð inn í vísunum þegar HSA genið var magnað upp af H1 ferjunni. HSA genið, V5 og His6 merkiröð voru mögnuð upp með vísunum WIZHSA-NotI-For án Kozak eða WIZ-HSA-NotI2-For með Kozak röðinni og WIZHSA-BamHI-Rev. Innskot voru staðfest með PCR með WIZHSA-NotI-For eða WIZ-HSA-NotI2-For og WIZHSA-BamHI-Rev og með vísunum WIZHSA-5-For og WIZHSA-5-Rev. Með því að klippa með NotI og BamHI og með XhoI skerðiensímunum og bera saman við klipptar tómar ferjur voru innskotin staðfest. Einnig voru innskotin staðfest með raðgreiningu yfir samskeyti ferju og innskots með WIZHSA-1-For, WIZHSA-1-Rev, WIZHSA-6-For og WIZHSA-6-Rev.

pBudCE4.1/lacZ/CAT

Viðmiðunarferjan pBudCE4.1/lacZ/CAT var frá Invitrogen.

Ferjurnar sem notaðar voru sem viðmið í rauntíma PCR

Ferjurnar sem voru notaðar sem staðlar í rauntíma PCR voru allar búnar til á Keldum nema IL-5/pcDNA3.1/Zeo ferjan sem var fengin frá David Horohov (Louisiana State University, USA) (sjá töflu 5). Markgenin voru mögnuð upp úr cDNA safni úr hesti frá Keldum (Tvistur) og voru innskotin staðfest með raðgreiningu með sértækum vísunum og þekktum vísunum sem bindast á ferjurnar.

Tafla 5. Ferjurnar fyrir rauntíma PCR.

Markgen	Stærð gens	Stærð innskots	Plasmíð	Plasmíð + innskot	MW ¹
IL-4	412	346	pUC18	3032	2 x 10 ⁶ g/mól
IFN- γ	571	429	pUC18	3115	2 x 10 ⁶ g/mól
β -actin	1128	450	pUC18	3136	2 x 10 ⁶ g/mól
β -actin	1128	985	pBluescript	3985	2,6 x 10 ⁶ g/mól
IL-5	405	216	pcDNA3.1/Zeo	5216	3,4 x 10 ⁶ g/mól
IL-10	739	510	pBluescript	3429	2,2 x 10 ⁶ g/mól
TNF- α	705	694	pBluescript	3724	2,4 x 10 ⁶ g/mól

1) MW: mólmassi ferju fenginn með því að margfalda basafjölda ferju (plasmíð + innskot) með meðalmólmassa basapars, sem er 649 g/mól.

Magna og klóna þurfti TNF- α inn í plasmíð til að geta unnið með það sem staðal í rauntíma PCR. Fyrst voru hannaðir vísarnir Eq-TNF α -HindIII-F og Eq-TNF α -XbaI-R með skerðiensímahala og þeir notaðir til að magna upp TNF- α upp úr cDNA safni úr nokkrum hestum en þeir virkuðu ekki. Þá voru hannaðir nýjir primerar án hala Eq-TNF α -1F, Eq-TNF α -12F, Eq-TNF α -700R og Eq-TNF α -705R. Eq-TNF α -12F virkaði bæði á móti Eq-TNF α -700R og Eq-TNF α -705R. Gert áfanga PCR; PCR hvarf með Eq-TNF α -12F annars vegar á móti Eq-TNF α -700R og hins vegar Eq-TNF α -705R, PCR afurðin hreinsuð á súlu með Millipore setti, PCR gert á hreinsaðri afurð með vísunum Eq-TNF α -HindIII-12F, Eq-TNF α -XbaI-700R og Eq-TNF α -XbaI-R, sú PCR afurð hreinsuð úr agarósa hlaupi með QIAEXII settinu (QIAGEN), klippt með HindIII og XbaI skerðiensímunum og hreinsuð úr agarósa hlaupi með QIAEXII settinu. Bluescriptferja var klippt með HindIII og XbaI skerðiensímunum og hreinsuð úr agarósa hlaupi með QIAEXII setti. PCR afurðirnar voru límdar inn í bluescriptferju með T4 lígasa. Límingin var afvirkjuð, gerð himnuskiljun og síðan rafgatað inn í DH5 α *E. coli* frumur. Engar bakteríuþyrpingar uxu, þ.e. klónunin tókst ekki. Gert PCR með TNF α -12F og Eq-TNF α -705R og það klónað inn í pCR2.1-TOPO ferju úr TOPO TA settinu (Invitrogen). Ummyndað inn í DH5 α *E. coli* frumur með hitasjokki. Hvítar bakteríuþyrpingar voru pikkaðar og gert PCR á bakteríuþyrpingunni með M13 forward annars vegar og hins vegar TNF α -12F á móti Eq-TNF α -705R vísunum. Jákvæðar bakteríuþyrpingar voru ræktaðar upp og einangraðar með Miniprep aðferðinni. TNF- α var klippt út úr pCR2.1-TOPO ferjunni með HindIII og XbaI skerðiensímunum og hreinsað úr agarósa hlaupi með QIAEXII settinu, síðan límt inn í bluescriptferju með T4 lígasa og ummyndað inn í DH5 α *E. coli* frumur með hitasjokki. Gert var PCR á hvítum bakteríuþyrpingum og jákvæðar þyrpingar ræktaðar upp og einangraðar með Miniprep aðferðinni. Innskotið var staðfest með áðurnefndum vísunum í PCR og síðan rafdreigið í agarósa hlaupi, með raðgreiningu og

með því að klippa með HindIII og XbaI skerðiensímunum einum og sér eða saman. Neikvætt viðmið var ddH₂O.

Gerð pBluescript ferju með endurteknum CpG stefnum.

Einhátta raðir, 39 basar með fosfór á endanum, með tveimur mýsa- (GACGTT) eða tveimur hestastefjum (GTCGTT) ásamt samfallandi (complement) einhátta röðum voru nýmyndaðar hjá TAG Copenhagen (Kojima et al., 2002) (Tafla 6).

Tafla 6. CpG raðir klónaðar inn í pBluescript SK+ tjáningarferju.

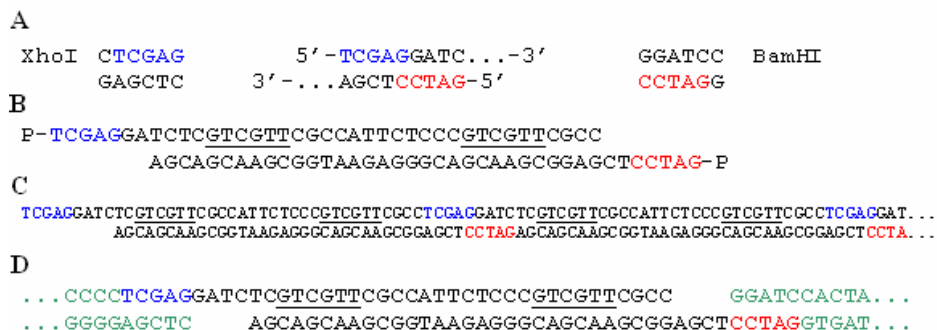
BH eru með hestastef, BM eru með músastef, F stendur fyrir forward og er einhátta röð með CpG stef, R stendur fyrir reverse og er mótlæg röð fyrir CpG röðina. Bláir basar tákna XhoI skerðiset, rauðir basar tákna BamHI skerðiset og undirstrikaðir basar tákna CpG stefin.

Nafn	Basaröð
BH_GTCGTT_F	5'-phosphate- <u>TCGAGGATCTCGTCGTT</u> CGCCATTCTCCC <u>GTCGTT</u> CGCC-3'
BH_GTCGTT_R	5'-phosphate- <u>GATCCT</u> CGAGGCGAACGACGGGAGAATGGCGAACGACGA-3'
BM_GACGTT_F	5'-phosphate- <u>TCGAGGATCTCGACGTT</u> CGCCATTCTCCC <u>GACGTT</u> CGCC-3'
BM_GACGTT_R	5'-phosphate- <u>GATCCT</u> CGAGGCGAACGTCGGGAGAATGGCGAACGTCGA-3'

Raðirnar voru hannaðar þannig að 5' endi þeirra skarar fram úr samfallandi röðinni þegar þær mynda tvíhátta röð þannig að samloðunarendar myndast og á þeim eru skerðiset, XhoI á CpG einhátta röðinni og BamHI á samfallandi einhátta röðinni. Samloðunarendinn á 5' enda passar við samloðunarendann á 3' enda svo hægt er að búa til samhangandi röð með mismörgum CpG stefnum þegar þær hafa þáttatengst (Mynd 8).

Notuð voru skerðiensímin BamHI og XhoI til að klippa pBluescript II SK+ og mynda samloðunarenda (sticky ends), afurðin var hreinsuð á hlaupi með QIAEXII.

Blandað var saman 10 µl af 100 µM einhátta CpG röð (F) og 10 µl af 100 µM mótlægri röð (R) og út í það sett 2,2 µl af Annealing Buffer x10 (200 mM Tris*HCl pH 7,5, 20 mM MgCl₂, 500 mM NaCl). Raðirnar voru eðlissviptar við 85°C í 5 mín. og kældar niður rólega að herbergishita í 30 mín., látnar þáttatengjast með samloðunarendum og límðar með T4 DNA lígasa inn í klippta og hreinsaða bluescriptferju yfir nótt við 14°C (CpG tvíhátta lausnin í 10x meiri styrk en bluescriptferjan). Raðirnar höfðu fosfór á endanum sem auðveldaði tvíhátta röðunum að tengjast og að límast inn í klippta bluescriptferju. Klenow Fragment ásamt Klenow



Mynd 8. Samloðunarendar CpG raða.

Bláir basar tákna XhoI skerðiset, rauðir basar tákna BamHI skerðiset, grænir basar tákna bluescriptferju og undirstrikaðir basar tákna CpG stefin. (A) Skerðisetin XhoI og BamHI og hvernig þau geta þáttatengst. (B) CpG basaröð og samfallandi/mótlæg röð mynda tvíþátta röð með fosfór (P) á endunum. (C) Samloðunarendinn á 5' enda passar við samloðunarendann á 3' enda svo hægt er að búa til samhangandi röð með mismörgum CpG stefnum. (D) Tvíþátta CpG röð límist inn í bluescriptferju með hjálp T4 DNA lígasa og Klenow fyllir upp í bilið.

buffer og dNTP var sett út í líminguna síðustu 20 mínúturnar við 37°C og síðan 70°C í 10 mín. til að afvirkja ensímin. Klenow DNA polymerase I frá New England BioLabs hefur 3' til 5' exonucleasa virkni. Saltstyrkur sýnisins var jafnaður með himnuskiljun til að minnka rafleiðni og rafgatað í DH5α. Gerðir voru nokkrir klónar af bluescriptferjunni með mismörgum eintökum af stefnum sem var staðfest með blá/hvítri skimun og kolóníu PCR, með vísunum T7 og NEB1233. Bluescriptferja er með þrjú hestastef og eitt músastef. Viðmiðunarferja var tóm bluescriptferja þar sem búið var að klippa burt skerðisvæðið milli XhoI og BamHI en það límdist saman með hjálp T4 lígasa og Klenow Fragment polymerasa. Tóm bluescriptferja og ferjur með músa- eða hesta CpG röðunum voru einangraðar, hreinsaðar á Quiagen súlum, bæði með MidiPrep aðferð og EndoFree aðferðinni og magnmældar.

3.3 Bakteríuvinna

3.3.1 Bakteríufrumur

Notaður var bakteríufrumustofninn *E. coli* DH5-α sem hefur arfgerðina supE44 ΔlacU169 (Φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1.

Bakteríufrumurnar voru gerðar móttækilegar fyrir DNA með rafgötun og hitasjokki.

3.3.2 Bakteríuæti

<u>LB-æti (1L)</u>	<u>LB-agar (1L)</u>	<u>SOB-æti (1L)</u>
10 g tryptone	10 g tryptone	20 g tryptone
5 g yeast extract	5 g yeast extract	5 g yeast extract
5 g NaCl	5 g NaCl	0,5 g NaCl
1 ml 1N NaOH	1 ml 1N NaOH	H ₂ O að 1 lítra (pH 7)
H ₂ O að 1 lítra	15 g agar	Sæft og kælt niður í 60°C
Sæft	H ₂ O að 1 lítra	5 ml af sterílu 2M MgCl ₂
	Sæft	

SOC-æti (100 ml)

2 ml af sterílu 1 M glúkósa sett út í 100 ml SOB æti til að fá SOC æti. Sæft.

3.3.3 Ummyndun

Ummyndun móttækilegra DH5 α frumna með plasmíðum var annars vegar gerð með rafgötun (a) og hins vegar með hitasjokki (b). Allur efniviður sem var notaður í báðum aðferðum var kældur áður og unnið á ís.

a) Ef ummynda átti límingu var saltstyrkur sýnisins fyrst jafnaður með himnuskiljun til að minnka rafleiðni. Millipore himna (0,025 μ m) var látin á ddH₂O á petriskál og látin blotna í 1 mín. Límingalausnin var látin standa á himnunni í 30-60 mín. Einn til þrjár μ l af DNA var blandað út í frumurnar og lausnin flutt yfir í 0,2 cm kúvettu. Kúvetta sett í rafgötunartæki (GENE PULSER[®] II frá BIO-RAD) og frumur rafgataðar við 1,8 kV og 200 ohm viðnám. Frumurnar voru settar yfir í glas með forkældum 900 μ l LB 2% glúkósa og forræktaðar í hristikistu í 60 mín. við 37°C. Síðan var vökvaætinu dreift á ætisskálar og ræktaðar yfir nótt í 37°C hitaskáp.

b) Þegar ummynda átti með hitasjokks aðferðinni var 1-3 μ l af DNA sett út í frumurnar, blandað og haft á ís í 30 mín. Sýni hitað í hitablokk við 42°C í 1 mín. og síðan sett á ís í 2 mín. Frumurnar settar yfir í glas með forkældu 400 μ l af SOC æti. Sett í 37°C hristikistu (215-250 rpm) í 1 klst. Síðan var vökvaætinu dreift á ætisskálar og ræktaðar yfir nótt í 37°C hitaskáp.

3.3.4 Skimun

Þremur mismunandi aðferðum var beitt til að skima fyrir bakteríuþyrpingu með réttu erfðaefnis innskoti. Grunnaðferðin var að nota fúkalyf en síðan var líka notast við PCR og blá/hvíta skimun. Plasmíðin sem ummynduð voru inn í bakteríufrumurnar höfðu ákveðin valgen sem gerir frumurnar þolnar fyrir fúkalyfjum. Þær frumur sem höfðu tekið upp erfðaeefni uxu á ætisskálum eða í vökvarækt með fúkalyfjum.

Fúkalyfin sem notast var við í jákvæðu vali voru ampicillin, zeocin og kanamycin.

Þegar athuga þurfti hvort að ætlað erfðaeftni væri í bakteríuþyrpingum var pikkað í þær og leystar upp í ddH₂O dropa og strikað út á nýja agarskál eða sett í vökvarækt. Í PCR hvarfið voru síðan notaðir 3 µl úr dropanum.

Sum plasmíðin höfðu gen (*lacZ*) sem skráir fyrir hluta af β-galactosidasa ensíminu. β-galactosidasi klýfur X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) galactósaafleiðu í tvennt sem verður við það blá. Til þess að geta notað þessa aðferð var 40 µl X-gal og 10-40 µl IPTG valda á agarskálarnar áður en bakteríuræktinni var valda á. IPTG (isopropylthio-β-D-galactoside) örvar umritun *lacZ*. Þegar DNA klónast inn í plasmíð eyðurleggur það β-galactosidasa genið og bakteríuþyrpingin verður hvít en blá ef tómt plasmíð er tekið upp.

3.3.5 Plasmíðeinangrun og hreinsun

Bakteríuþyrpingar sem reyndust jákvæðar eftir skimun voru teknar með sterílum tannstöngli eða lykkju og settar í 37°C vökvarækt yfir nótt með viðeigandi fúkalyfi. Bakteríuræktin var spunnin niður, floti hent en plasmíðin einangruð úr bakteríunum með mismunandi settum frá QIAGEN. QIAprep Spin Miniprep Kit Protocol notað til að einangra úr 2-4 ml vökvarækt, QIAGEN Plasmid Midi Kit úr 25-50 ml vökvarækt og QIAGEN EndoFree Plasmid Mega Kit var notað til að einangra plasmíð úr 0,5-1 lítra rækt þannig að hreinsað plasmíð væri laust við eiturfurðir bakteríunnar eins og lípópólísakkaríð (LPS). Farið var eftir leiðbeiningum frá framleiðanda við einangrunina en aðferðin byggist á basísku frumurofi. Frumuleifar og prótein felld út og spunnin niður en flot sett á QIAGEN súlu. Plasmíðið binst QIAGEN neikvætt hlöðnum filter í súlunni við lágan salt- og pH styrk. RNA, prótein og önnur óhreinindi voru hreinsuð í burtu með saltlausn. Síðan var plasmíðið losað af súlunni með hárrí saltlausn og saltið hreinsað fá með isopropanóli og/eða etanóli. Plasmíðin voru ýmist leyst upp í EB, TE-dúa eða ddH₂O og geymd í -20°C.

3.4 Frumuvinna

3.4.1 Frumur og frumuræktun

Fyrsta stigs hestafumur (primer cell lines) voru búnar til á Keldum. Lungna- og nýrnafrumur úr hestaföstri og húð- og skeifugarnafrumur úr folaldi. COS-7 (ATCC)

er nýrnafrumulína úr Afrískum grænapa (African green monkey, *Cercopithecus aethiops*).

Lungna-, húð-, nýrna- og COS-7 frumur voru ræktaðar í Dulbecco's MEM (DMEM) (Invitrogen, GIBCO) með 2 mM glutamine, 100 IU/ml penicillin, 100 IU/ml streptomycin (ræktunaræti) og 10% fósturkálfasermi (fetal calf serum, FCS) (Invitrogen, GIBCO). Viðhaldsæti var sama æti nema að styrkur FCS var 1-5%. Skeifugarnafrumurnar voru ræktaðar í CS-S æti fyrir innþekjufrumur (Sigma) með 1% af innþekju vaxtarþætti (endothelial growth factor) (Sigma) og 10-20% FCS. Frumum var viðhaldið í sama æti með 5-10% FCS. Frumurnar voru ræktaðar í bökkum (6, 12, 24 eða 96 holu) eða flöskum (T25 eða T75) í rakamettuðum 37°C hitaskáp með 5% CO₂ styrk (frumuræktunarskáp).

3.4.2 Umrækt (Passeringar)

Frumurnar voru geymdar í fljótandi köfnunarefni og þegar þær voru teknar upp þá voru þær snöggþiðnar og settar á flöskur (T75 eða T25) í ræktunaræti með 10-20% FCS. COS-7 frumurnar voru notaðar í 10. umræktun frá innkaupum frá ATCC. Hestafrumurnar voru notaðar í lágum umræktunum (5.-10.). Við umrækt, þegar frumulagið hafði náð ætluðum þéttleika var ætið tekið ofan af og þvegið þrisvar með PBS með 100 IU/ml pencillin og 100 IU/ml streptomycin (PBS-pest). Settur 0,5-1 ml af trypsín versen vökva (1.000 ml PBS, 0,2 g EDTA, 0,5 g Trypsin) út á frumurnar. Vökvanum velt vel yfir allar frumurnar og sett inn í hitaskáp í nokkrar mínútur til að frumur losni af plastinu. Pipetterað nokkrum sinnum upp og niður til að losa sundur frumuklumpa. Settir um 4 ml af æti með fúkalyfi út í og blandað. Lausninni skipt upp og sett á bakka og skilið eftir hæfilegt magn á flöskunni. Þrír ml af ræktunaræti með 10% FCS settir í holu og 15 ml bætt út í flöskuna til að viðhalda frumuræktinni.

3.4.3 Genaleiðsla (transfection) í frumur

Tvær aðferðir voru notaðar til að genaleiða erfðaeefni inn í frumu, þar sem það er síðan flutt inn í kjarna og tjáð. Annars vegar var notað ExGen 500 (a) frá Fermentas sem er polyethylenimine sem bindur DNA og flytur inn í frumu með innfrumun og hins vegar Lipofectamine 2000 (b) frá Invitrogen sem er jákvæð fitusýra sem binst DNA og flytur í gegnum frumuhimnuna. Fylgt var leiðbeiningum frá framleiðenda. Passað var upp á að DNA væri mjög hreint til að genaleiðslan myndi heppnast vel, OD₂₆₀/OD₂₈₀ hlutfallið þurfti að vera 1,8 eða meira. Frumurnar voru undirbúnar á

svipaðan hátt fyrir báðar aðferðirnar þ.e. látnar vaxa í æti með sermi og fúkalyfjum en þegar frumuþekjan hafði náð réttum þéttleika var ætið tekið af, frumurnar þvegnar þrisvar sinnum með PBS án fúkalyfja og nýtt æti sett á með sermi en án fúkalyfja, haft í frumuræktunarskáp í 24-48 klst. Neikvætt viðmið voru frumur sem fengu sömu meðferð með ExGen 500 eða Lipofectamine 2000 en án erfðaefnis. Genaleiðslan var einstaka sinnum framkvæmd í T25 flöskum en yfirleitt í 12 holu bökkum (Nunc).

a) ExGen 500: Frumuþekjan var látin ná 50-70% þéttni. DNA þynnt í 150 mM NaCl og rúmmál u.þ.b. 1/10 af heild í holu. ExGen 500 bætt út í, notað var 3,3 µl ExGen 500 á móti µg af DNA og síðan hrist á vortex í 10 sek. og látið vera við stofuhita í 10 mín. ExGen/DNA blandan sett á frumurnar. Ræktinni var velt varlega til að blanda og sett í frumuræktunarskáp.

b) Lipofectamine 2000: Frumuþekjan var látin ná 90-95% þéttni. Lipofectamine 2000 var þynnt 1: 25 í Opti-MEM (Invitrogen, GIBCO) (85 µl) og inkúberað 5 mín. við herbergishita. DNA var þynnt 1.35 µg/ml í Opti-MEM (85 µl) og blandað við Lipofectamine 2000/Opti-MEM, látið standa í 20 mín. við herbergishita og síðan sett út á frumurnar. Ræktinni velt varlega til að blanda og sett í frumuræktunarskáp.

Þegar viðmiðunarferja var genaleidd með HSA ferju var notað 1,35 µg/ml af HSA ferju og 0,6 µg/ml af pBudCE4.1/lacZ/CAT ferjunni sem voru blandaðar í 100µl Opti-MEM.

Þegar samanburður var gerður á ExGen 500 og Lipofectamine 2000 genaleiðslunum var frumuþekjan höfð þéttari en mælt er með hjá ExGen 500.

Áður en frumurnar voru hirtar var ræktin skoðuð og skráðar niður athugasemdir. Frumurnar voru hirtar með því að skafa af botninum og pípeterað yfir í 1,5 ml eppendorf glas. Spunnið niður, 3.000 rpm í 15 mín. við 4°C. Flotið tekið ofan af botnfalli og hent. Sett 50 µl af PBS út í botnfall og 60 ul af 2x Red. dúa og geymt í frysti þar til tjáning próteins var skoðuð í ónæmisþrykki.

Þegar viðmiðunarferjan pBudCE4.1/lacZ/CAT var genaleidd með eða án HSA ferju var botnfallið leyst upp eftir fyrsta spunann með 500 µl af PBS, spunnið niður á 3500 rpm í 15 mín. við 4°C. Floti hent og 50 µl af PBS sett út í botnfallið, blandað og því skipt í tvennt þar sem annars vegar voru 25 µl blandaðir við 25 µl af 2x red. dúa og hins vegar 25 µl spunnir niður aftur, PBS hirt af og sett 50 µl af lysis buffer út í (Luciferase 3x Cell Lysis Buffer úr Enhanced Luciferase Assay Kit, Phar Mingen, A

Becton Dickinson, þynnt í ddH₂O 1:3). Mælt strax með CPRG prófi eða sett í -80°C frysti.

3.4.4 Ónæmisþrykk (Western blot)

Tjáning HSA og CAT var skoðuð í ónæmisþrykki (Western blot, WB) þar sem litað var fyrir V5 vakaeiningunni. SDS-PAGE var gert í Mini-protean II system frá Bio-Rad samkvæmt leiðbeiningum framleiðanda. Genaleiddar frumur og viðmiðs frumur voru soðnar í 2x “reducing sample” dúa (1:1 rúmmál) í 5 mín. og hlaðið á 12% aðskilnaðar hlaup (denaturing 12% separation gel) og svo rafdreigið í 45-60 mín. við 200 Volt og 50-65 amp. Notaður var stiginn Prestained Protein Ladder (10-180 kDa) frá Fermentas. Síðan voru sýnin flutt yfir á nælonhimnu, Immobilon-P membrane (Millipore), með hálfþurru (semi-dry) MilliBlot Graphite Electrobloetter (Millipore). Nælonhimnur voru blokkeraðar í a.m.k. 1 klst. með TBS-T dúa með 2% Tween 20 og síðan þvegnar 5 sinnum með TBS-T dúa (TBS-T: 0,1% Tween-20, 0,8% NaCl í 20 mM Tris-HCl, pH 7,6). Nælonhimnur voru hafðar yfir nótt við 4°C með 1:5.000 músa einstofna mótefni gegn V5 (Invitrogen) og svo þvegnar 4 sinnum með TBS-T dúa. Síðan hafðar í 1 klst. við herbergishita með geita anti-músa IgG merktu með alkaline phosphatase (Dako) 1:1.000 og þvegnar 5 sinnum með TBS-T dúa. Að lokum voru bundin mótefni numin með nitro blue tetrazolium chloride og 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (NBT/BCIP) (Roche) þynntur í alkalískum fosfatasa dúa (100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 100 mM Tris, pH 9,5).

3.4.5 Mæling á β-galactosida virkni úr spendýrafrumum með CPRG

Virkni β-galactosidasa var mæld til að leiðrétta fyrir mismunandi magni genaleiddra ferja og hirtra frumna af bökkunum. Virkni β-galactosida var mæld með efninu chlorophenol red β-galactopyranoside (CPRG). Hægt var að gera CPRG prófið á þeim frumum sem voru genaleiddar með lacZ geni en það tjáir β-galactosidase. Þær frumur voru sprengdar og hafðar í dúa með CPRG efninu í. CPRG er gult og β-Galactosidase klýfur það niður í galactose og í chromophore chlorophenol red, sem gerir lausnina dökkrauða og gleypir ljós í kringum 560 nm. Kínétísk mæling var gerð á virkni á β-galactosida ensíminu en það þurfti að mæla á mínútu fresti í klst. til að fá upphafsvirkni ensímsins. Sett var 20 µl af frumhrati í glæra 96 holu plötu (Nunc, clear polystyrene microplate) og bætt 200 µl af “Assay substrate” út í. Ljósgleypnin var mæld við 550 nm við 37°C á mínútu fresti í klst. og bakkinn hristur á milli

mælinga. “Assay substrate” var blandaður fyrir hvert hvarf en í einum ml var 200µl 5x Z Buffer (350 mM Na₂HPO₄, 158 mM NaH₂PO₄·H₂O, 50 mM KCl, 10 mM MgSO₄·7H₂O), 1 µl 0,5 M CPRG, 1,4 µl β-mercaptoethanol (ME, Merck) og 800 µl dd H₂O.

3.4.6 Einangrun og örvun hvítfrumna úr hestablóði

Blóðfrumur voru aðskildar á stigli sem var settur upp samkvæmt aðferðalýsingu frá Amersham (Biosciences, Ficoll-Paque™PLUS). Spuninn var 1.800 rpm í 30 mín. við herbergishita (GS-6R Centrifuge, Beckman). Hvítfrumuband sem innihélt hnattkjarna frumur úr blóði (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) var hirt. Frumur voru þvegnar í PBS-pest og spunnar niður milli þvotta, fyrst við 2.000 rpm í 20 mín. og síðan nokkrum sinnum við 1.000 rpm í 15 mín. (MSE Chilspin 2). Hvítfrumur voru síðan leystar upp í æti, DMEM með 10% hestasermi (útbúið á Keldum), 5x10⁻⁵ M ME, 2 mM glutamine, 100 IU/ml pencillin og 100 IU/ml streptomycin. Frumufjöldi var metinn í smásjá (Leitz) á talningagleri (Neubauer). Í hverja holu á 24 holu Nunc bakka voru settar 5x10⁶ frumur í 1,5 ml af æti. Frumur voru síðan örvaðar *in vitro* annars vegar með ósérvirkum frumuörva, þ.e. mítógeni, phytohemagglutinin (PHA, Sigma), 1 µg/ml eða LPS (Sigma), 10 – 50 µg/ml og hins vegar með sérvirkum örva, HSA próteini, 100 µg/ml, Polyarginine (PA, Sigma), 5 µg/ml, Muramyl dipeptid (MDP, Sigma), 5 µg/ml eða með bluescriptferjum með eða án auka CpG stefjum, 2 µg/ml. Óörvaðar hvítfrumur voru hafðar með til samanburðar. Frumurækt var höfð í frumuræktunarskáp í 4, 8, 18 eða 24 klst. Vakur voru leystir upp í DMEM æti (án pen/strep og sermi) og dauðhreinsaðir með því að sía í gegnum 0,22 µm síu frá Millepore.

Þegar örvað var með γ-herpesveiru var notast við sýni þar sem nýrnafrumurækt úr hesti hafði verið sýkt með hreinsaðri hestaherpesveiru (Equine herpes virus-2, EHV-2) í ræktunarskáp og haft í frumuræktunarskáp í 7 daga eða þar til 90-100% frumudrepandi áhrif voru komin fram. Viðmiðunarsýni voru meðhöndluð eins, en án veiru. Eftir 7 daga voru frumurnar skrapaðar af, spunnar niður, þvegnar með PBS, spunnar niður aftur og sprengjudúu settur út á botnfallið. Sýnin síðan fryst við -80°C, látin þiðna við 50°C og hljóðþylgjurofin (sonicated) tvisvar í 15 sek. á ís. Frumuhratið var síðan spunnið niður og flotið hirt af og geymt við -80°C. Veiran sem notuð var til að sýkja með var einangruð EHV-2 en það er ekki hægt að sjá hvort að hestur sé

sýktur af EHV-2 eða EHV-5 því breiðvirk mótefnapróf greina ekki á milli þeirra. Því verður hér eftir notað γ -herpes.

Þegar hvítfrumur hesta voru örvaðar *in vitro* með γ -herpes eða viðmiðunarfloti voru 5×10^6 frumur úr hesti í 1,5 ml af æti sett í tilraunaglas, spunnið niður við 1.200 rpm í 15 mín. Flot hirt ofan af og settir 750 μ l af γ -herpes eða viðmiðunarfloti út í og haft á vöggu í rúma 2 klst. við 37°C. Síðan 750 μ l af ræktunaræti með 10% hestasermi bætt út í og sett á plötu inn í frumuræktunarskáp.

3.4.7 Hirðing á frumum

Frumurækt var skoðuð í smásjá og athugað hvort munur væri á holum m.t.t. þess hvort frumur hefðu örvast (klumpast saman) eða ekki. Frumur voru losaðar af botni frumuræktunarbakkans með því að pumpa með Pasteur pípettu og færðar yfir í 2 ml skilvinduglas (eppendorfglas). Skiljun við 3.000 rpm í 5 mín. Flotið tekið af botnfallinu og botnfall leyst upp í sprengidúa, 350 μ l af sprengidúa og 2,5 μ l af ME sem voru úr Absolutely RNATM RT-PCR Miniprep (Stratagen) setti. Lausnin var gerð einsleit með því að hrista hana. Frumulausn í sprengidúa var geymd í fljótandi köfnunarefni í Nunc frystiglösnum til þess að koma í veg fyrir niðurbrot á RNA.

3.4.8 Einangrun á mRNA

Til að einangra mRNA úr frumunum var notað Absolutely RNATM RT-PCR Miniprep Kit og fylgt aðferðalýsingu úr bæklingi frá framleiðanda. "Absolutely RNA" aðferðin byggist á notkun spunabolla (spin cup) með kísilsíu (silica-based fiber matrix) sem bindur RNA þegar "chaotropic" salt er til staðar meðan röð þvotta þvæ burt aðskotasefni. Sprengidúinn inniheldur "guanidine thiocyanate" sem sprengir frumur og kemur í veg fyrir að RNA sé brotið niður af ribónúkleasa (RNase). Eftir frumurofið voru sýnin forsíuð í spunabolla sem fjarlægir frumuleifar og minnkar magn DNA. Síður vökvinn var fluttur á kísilsíu spunabollann þar sem RNA binst síunni. Meðhöndlun með lágsalta þvottadúa og meltingu með DNase fjarlægði það sem eftir var af DNA. Röð þvotta fjarlægði DNA og önnur prótein. RNA var losað úr síunni með lágjóna-sterkum dúa. RNA sýnið var sett í frystiglas (Nunc, 1,0 ml) og fryst í fljótandi köfnunarefni.

3.4.9 Myndun á cDNA

Til að búa til cDNA var notað StrataScript™ First-Strand Synthesis System sett (RT-PCR Kit) frá Stratagene. Blandað var saman 14 µl af RNA og 24 µl DEPC-vatni ásamt 3 µl oligo(dT)vísi (100 ng/µl). Hitað á hitaplötu við 65°C í 5 mín. Hvarflausn kæld hægt niður við herbergishita í u.þ.b. 10 mín., til þess að leyfa vísinum að tengjast (anneal) við RNA afurð. Til þess að mynda fyrsta þátt cDNA var blandað saman við hvarfblönduna 5 µl af 10x first strand buffer, 1 µl af Rnasa Block Ribonucleasa Inhibitor, 2 µl af 100 mM dNTPs og 1 µl StrataScript™reverse transcriptasa. Lausnin var höfð á hitaplötu við 42°C í 1 klst. og við 90°C í 5 mín. Sett beint á ís eftir það og cDNA síðan geymt í frysti við -80°C.

3.4.10 Rauntíma PCR

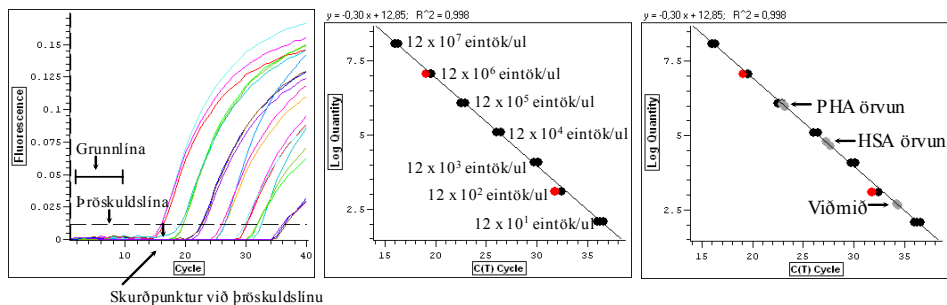
TaqMan aðferðin sameinar hitahvarf og mælingu á flúrljómun. Eftir hvert hitahvarf sést aukning á PCR afurðum sem gefur magnbundnar niðurstöður. Þreifarinn er úr fákirnum (oligonucleotide) með áföstum litavísi (reporter dye, FAM) og ljómdeyfi (quencher dye). Litvísirinn gefur frá sér stuttar bylgjulengdir en ljómdeyfirinn langar bylgjulengdir og tekur við orku frá litavísinum og kemur þannig í veg fyrir að hann flúrljómi. Þreifarinn binst sérhæft milli forward og reverse vísanna. Vegna kirmissundrunar (nucleolytic) virkni polymerasans “brotnar” þreifarinn af, sem leiðir til þess að flúrljómun litavísis eykst. Með því að nema flúorljómun við hvern hring er hægt að mæla magn af DNA sem upphaflega var til staðar í sýninu. Tækið nemur flúrljómunina og ber hana saman við staðalkúrfu og reiknar úr magn DNA sem er mælt.

Til að geta mælt hvort ónæmissvar hestanna væri á Th1 eða Th2 braut voru settar upp staðlaðar boðefnamælingar. Hannaðir voru vísar og flúrmerktir þreifarar samkvæmt ákveðnum skilgreiningum TaqMan aðferðarinnar (PE_Biosystems) fyrir hvert boðefni; IL-4 og IL-5 fyrir Th2 braut og IFN- γ fyrir Th1 braut. Einnig voru hannaðir vísar og þreifari fyrir TNF- α til að mæla meðfædda ónæmissvarið og IL-10 sem er stjórnboðefni. Sem viðmið var β -actin notað því það er stöðugt og framleitt í öllum frumum í miklu mæli (housekeeping gene) (sjá töflu 7).

Tafla 7 Vísar og þreififarar fyrir rauntíma PCR.

Nafn vísis	Basaröð vísis	Bútur
IL-4_TaqFor	5'-CTGCAAAGGTGCTTCAACAG-3'	110
IL-4_TaqRev	5'- AGTACAGCAGGTCCCGTTG-3'	
IL-4_TaqProbe	5'-FAM-CCAGTCCGCTCAGGCATTCTTTG-BHQ-3'	
IFN-g_TaqFor	5'-TGGACACCATCAAGGAGGAC-3'	108
IFN-g_TaqRev	5'-GGACCTTCAGATCATTACCG-3'	
IFN-g_TaqProbe	5'-FAM-AGTTCTTTAACAGCAGCACACCAGCAAGC-BHQ-3'	
B-actin_TaqFor	5'-GGCATCCTGACCCTCAAGTA-3'	66
B-actin_TaqRev	5'-CTTCTCCATGTCGTCGCCAGT-3'	
B-actin_TaqProbe	5'-FAM-CATCGAGCACGGCATCGTCA-BHQ-3'	
B-actin2_TaqFor	5'- TCCCTGGAGAAGAGCTACGA -3'	97
B-actin2_TaqRev	5'- GGAAGGAGGGCTGGAAGAG -3'	
B-actin2_TaqProbe	5'-FAM- ATCACCATCGGCAACGAGCG -BHQ-3'	
B-actin3_TaqProbe	5'-FAM- ACCATCGGCAACGAGCGTT -BHQ-3'	
IL-5_Taq_For	5'-GTCTGTGCCCTTGCTGTAGA-3'	74
IL-5_Taq_Rev	5'-CGATGAGTGGAGAGCAGTGT-3'	
IL-5_Taq_Probe	5'-FAM-CCCATGAACAGACTAGTGGCAGAGACC-BHQ-3'	
IL10_Taq_For	5'-TTAAGGGTTACCTGGGTTGC-3'	108
IL10_Taq_Rev	5'-TTCACGTGCTCCTTGATGTC-3'	
IL10_Taq_Probe	5'-FAM-CAGGCTGAGAACCACGGCCC-BHQ-3'	
IL10_Taq_2For	5'-GACATCAAGGAGCACGTGAA-3'	91
IL10_Taq_2Rev	5'-TTTCACAGGGCAGAAATCG-3'	
IL10_Taq_2Probe	5'-FAM-ACCCTCCGAGTGAGGCTGCG-BHQ-3'	
TNFa_Taq_For	5'-GAATGCCTTCCAGTCAATCA-3'	79
TNFa_Taq_Rev	5'-GGCTACAGGCTTGCTACTTG-3'	
TNFa_Taq_probe	5'-FAM-CCCTCTGGCCCAGACACTCAGA-BHQ-3'	

Markgenin voru raðgreind og klónuð inn í ferjur (sjá í kafla 3.2.8). Gerð var staðalkúrfa fyrir hvert markgen með tífaldrri þynningu af ferju (6×10^7 eintök/ μ l – 6×10^1 eintök/ μ l) en til þess þurfti að mæla styrk hvernar ferju og vita mólmassa hennar (sjá töflu 5 í kafla 3.2.8). Ferjurnar voru þynntar í TLE dúa (Tris low buffer: 10 mM EDTA, 1 mM Tris). Þröskuldslínan var stillt þannig að hún skaraðist við þar sem magnbundnar kúrfur raðþynninganna koma upp og mynda bestu beinu línu. Magn markgena í sýnum var reiknað út frá skurðpunkti flúrljómunar við þröskuldslínuna. Grunnlínan var stillt á milli hrings 3 og 10 og flúrljómunin á því bili var skilgreind sem bakgrunnur og var dregin frá flúrljómuninni sem fékkst í hverjum brunni (sjá mynd 9).



Mynd 9. Útreikningar boðefnastaðalkúrfa.

TaqMan aðferðin byggist á PCR tækni og flúrljómunar-greiningu á rauntíma. Hægt er að greina PCR mögnun með flúrljómandi þreifurum þar sem ákveðnar raðir eru magnaðar upp með viðeigandi vísu. Með því að nema flúrljómun við hvern hring og bera hana saman við staðalkúrfa er hægt að reikna út magn af DNA sem upphaflega var til staðar í sýninu.

Útreikningar á boðefnamagni í sýnum: β -actin framleiðsla var deilt upp í boðefna framleiðslu og síðan deilt upp í þá tölu með ætistuðlinum (boðefnaæti deilt með β -actin æti) og það margfaldað með 100.000.

$$\frac{\text{Boðefnaframleiðsla sýnis með vaka} / \beta\text{-actin framleiðsla sýnis með vaka} * 100.000}{\text{Boðefnaframleiðsla í æti} / \beta\text{-actin framleiðsla í æti}}$$

<u>PCR grunnblanda</u>	<u>Dynazyme</u>	<u>Taq</u>
DNA mót	2 μ L	2 μ L
dNTP blanda (2 mM)	2 μ l	2 μ l
10x PCR buffer	2 μ l	2 μ l
Vísir fyrir plúspátt (20 μ M)	1 μ l	1 μ l
Vísir fyrir mínuspátt (20 μ M)	1 μ l	1 μ l
Þreifari (10 μ M)	0,5 μ l	0,5 μ l
Dynazyme polymerase	0,2 μ l	
Taq polymerase		0,1 μ l
ddH ₂ O fyllt upp að 20 μ l		
Öll hvarfefni höfð á ís.		

PCR hvarf: 2 mín. við 95°C og síðan 40 hringir af 15 sek. við 95°C og 1 mín. við 60°C. Notað var “pseudo-hotstart”, þ.e. sýnin höfð á ís og ekki sett í blokkina fyrr en hún var orðin 90°C.

PCR tæki: DNA Engine OPTICON™ Continuous Fluorescence Detector frá MJ Research.

3.4.11 Frumufjölgunarpróf

Blóðfrumur voru aðskildar á stigli, hvítfrumuband hirt, frumurnar þvegnaðar og taldar (eins og lýst var í kafla 3.4.6). Frumurnar voru síðan örvaðar *in vitro* í 96 holu bakka

með kúptum botni. Yfirleitt voru hafðar 5×10^4 frumur í holu. Jákvætt örvunarviðmið var mítógenið PHA, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (6 holur) en einnig var LPS prófað í mismunandi þynningum (3 holur) og neikvætt viðmið var æti eitt og sér (6 holur). Í sértækri örvum t.d. með HSA próteini, peptíðum eða CpG röðum voru gerðar víðeigandi þynningar í þrem holum (triplikötum). Frumuræktin var höfð í frumuræktunarskáp í 5 nætur (c.a. 120 klst.) og síðustu nóttina með geislavirku thymidini ([methyl- ^3H] Thymidine, Amersham Biosciences). Frumurnar voru þvegnar með PBS-pest. Æti var DMEM ræktunaræti með 5×10^{-5} ME og 10% hestasermi. Frumuræktarbakkar og skilvinduglós voru frá Nunc. Frumurnar voru hirtar í frumuhirði (Titertek® Cell Harvester, Flow Laboratories, SkatronAS) á glerþráðapappír (Filter Mat, Skatron Instruments) sem settur var í plastglös með sindurvökva (Ultima Gold™ frá Packard) og síðan talið í β -sindurteljara (Liquid Scintillation Analyzer 1600CA TRI-CARB® frá Packard). Niðurstöður úr sindurteljara voru “counts per minute (cpm)”. Örvunarstuðull (stimulation index, SI) = örvun (cpm) í vaka/örvun (cpm) í æti. Miðað var við að örvun hefði átt sér stað ef örvunarstuðullinn var hærri en þrjár og dregin lína til viðmiðunar.

Þegar örvað var með γ -herpesveiru var γ -herpes eða viðmiðunarflot þynnt um $\frac{1}{2}$ eða $\frac{1}{4}$ með ræktunaræti með 10% hestasermi og sett út á frumurnar í 3 holur og gerð raðþynning.

3.4.12 Elisupróf fyrir HSA sérvirk mótefni hjá hestum

HSA (2 mg/ml) vaki var þynntur 1/500, þ.e. 20 μl HSA í 10 ml af þekjudúa (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Húðaðar 96 holu plötur (Nunc MaxiSorp) með 100 μl af HSA-þynningunni í hvern brunn og plötur geymdar yfir nótt við 4°C , svo frýstar í -20°C þar til notaðar. Plata þídd og þvegin þrisvar með u.þ.b. 3 mín. millibili (PBS + 1% Tween) og það ferli var endurtekið þrisvar sinnum til að losna við óbundin vaka úr holunum. Í hverja holu voru settir 200 μl af blokklausn (2% porcine skin gelatin, ICN eða Sigma, blandað í PBS-T) og platan var geymd við 37°C í 75 mín. Platan þvegin eins og áður. Gerð var 1/100 upphafsþynning af serminu (10 μl sermi í 1 ml PBS-T) og svo tvöfaldar þynningar á serminu, 1/200 - 1/400 - 1/800 o.s.frv. Í hverja holu í plötunni voru settir 100 μl af þynningum og PBS-T án sermis í 2 holur fyrir blank. Plastbakkinn var svo hafður í 90 mín. við 37°C til að mótefnin í serminu gætu bundist vakanum í holubotninum. Að þessu loknu var sermissýnunum skvett af og síðan var þvegið eins og áður til að losna við allt óbundið mótefni. Konjugat var “rabbit anti horse” tengt

ensíminu “horseradish peroxidase” (HRP) frá Sigma var þynnt 1/5.000, þ.e. 2 µl af rabbit-anti-horse var sett í 10 ml PBS-T fyrir hverja plötu. Í hverja holu á plötunni voru settir 100 µl og platan svo geymd í 60 mín. við 37°C. Þvegið var eins og áður til að losna við allt óbundið konjugat. Fjórar OPD hvarfefnistöflur (1,2 phenylendiamin dihydrochloride, 2 mg stk, Dakopats) voru leystar upp í 12 ml af eimuðu vatni. Í lausnina var svo bætt 5 µl af H₂O₂ rétt áður en að hvarfefni fór á plötuna. Í hverja holu voru settir 100 µl af hvarfelnislausninni og haft í myrkri við stofuhita í u.þ.b. 10 mín. Peroxidasinn HRP oxar OPD með súrefni frá peroxíðinu og myndar gulbrúna afurð. Hvarf var stöðvað með 75 µl 4NH₂SO₄ stoppsýru (11,2 ml conc. H₂SO₄ í 88,8 ml H₂O). Gleygni (absorbance) var lesin úr HTS 7000 Plus Bio Assay Reader frá Perkin Elmer á filter 492.

Elísupróf til að mæla HSA sérvirka IgG undirflokk hjá hestum

Til að mæla HSA sérvirka svörun IgGa, IgGb, IgGc og IgG(T) mótefnaflokka þá var bætt inn í einu skrefi eftir serumskref. Músamótefni gegn IgGa, IgGb, IgGc og IgG(T) frá Serotec voru þynnt 1/1.000 í PBS-T, sett í viðeigandi brunna og haft í 1 klst. við 37°C. Síðan þvegið og sett á konjúgatið HRP merkt geit-anti-mús í þynningu 1/2.000 og haft í 1 klst. við 37°C, síðan þvegið og sett á hvarfefni. Blankur var með öllu nema sermi þ.e. 2 holur fyrir hvern IgG undirflokk.

NIÐURSTÖÐUR

4.1 Uppsetning og stöðlun boðefnamælinga

β -actin

β -actin genið var klónað úr cDNA safni hests frá Keldum inn í bluescriptferju (sjá töflu 5). Tvö vísapör og þrjár þreifarar voru prófaðir og gaf þar nr 1 bestu staðalkúrfu og flúrljómun (sjá töflu 7 og mynd 10). Fyrir staðalkúrfu β -actins var notuð tífold þynning af ferju eins og fyrir boðefnin en vegna þess hvað mikið mældist af β -actini í sýnunum þurfti að byrja á hærri styrk eða 6×10^8 eintök/ μ l og staðalkúrfan látin ná niður í 6×10^3 eintök/ μ l en sýni mældust ekki minna en 6×10^4 eintök/ μ l.

IFN- γ

Rauntíma PCR mögnun á IFN- γ heppnaðist vel og gaf góða flúrljómun og staðalkúrfu þó stundum kæmi fyrir að neðstu þynningarnar næðust ekki inn (sjá mynd 10).

IL-4

Staðalkúrfan hjá IL-4 var ekki alltaf nógu góð, bæði var PCR mögnunin stundum ekki nógu góð og þar með lítil flúrljómun en í þeim tilvikum sást primer dimer í agarósa rafdrættinum (sjá mynd 10). Þar sem IL-4 mRNA er tjáð í litlu magni í mjög takmarkaðan tíma og brotnar fljótt niður (Rook et al., 2004) var reynd hirðing á frumum eftir 4, 18 og 24 tíma. Ekki fengust betri niðurstöður á þessum tímamunktum svo 24 tíma hirðing var notuð áfram.

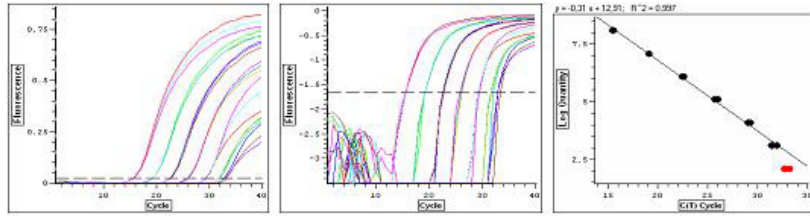
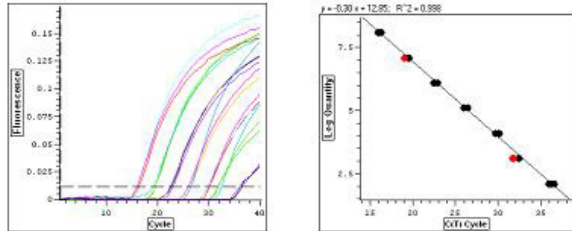
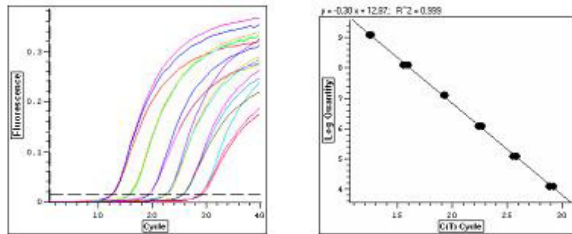
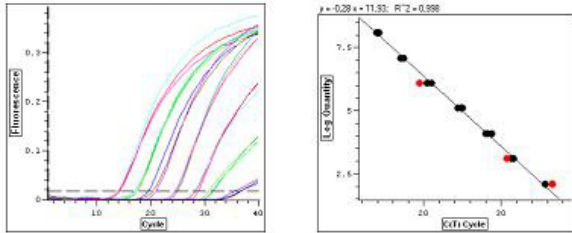
IL-5

IL-5 var prófað til að koma í staðinn fyrir IL-4 og var staðalkúrfu og flúrljómun IL-5 góð en niðurstöður mælinga á sýnum gáfu ekki skýran mun milli tímamunkta (sjá mynd 10).

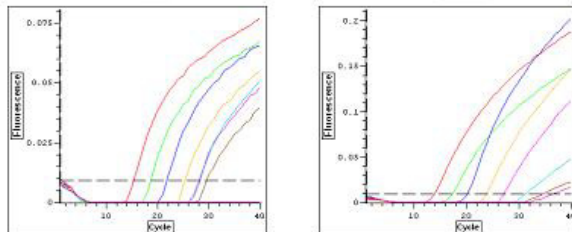
IL-10

Unnið var að því að búa til staðalkúrfu fyrir IL-10 og hönnuð 2 pör af vísam ásamt þreifurum en staðalkúrfan varð aldrei nógu góð, bæði náðust ekki inn neðstu þynningarnar og flúrljómunin var ekki nægilega mikil (sjá mynd 10).

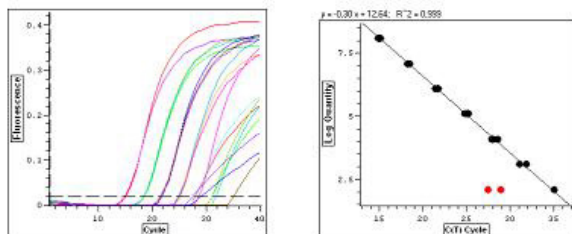
IL-4

IFN- γ  β -actinTNF- α 

IL-10
 Visa par nr 1 nær
 Visa par nr 2 fjær



IL-5



Mynd 10. Staðalkúrfur bóðefna.

TNF- α

Hluti TNF- α gensins var klónað í bluescriptferju sem viðmið í rauntíma PCR (sjá kafla 3.2.8). Hannað var eitt par af vísnum og þreifari samkvæmt TaqMan skilgreiningunni (sjá töflu 7). Fékkst góð staðalkúrfa (sjá mynd 10). Mögnun TNF- α í viðmiðunaræti var frekar hátt sem bendir til að eitthvað í ætinu sem ylli ósértækri örvun. Mæling á TNF- α í sýnum hirtum eftir 4, 8 og 24 tíma sýndi að best er að mæla TNF- α framleiðslu eftir 4 tíma (sjá mynd 26 í niðurstöðukafla 4.3.3).

4.2 Þróun og prófun á tjáningarferjum fyrir hesta DNA bóluefni

Ferjurnar sem notaðar voru til DNA bólusetningar í hestum voru báðar af pcDNA3.1 uppruna (pcDNA3.1/GS+HSA og pcDNA3.1/V5-His+HSA) en helsti munurinn á þeim var fúkalyfjaþolgenið. Tjáning ferja, pcDNA3.1 og VR1012 með CAT merkigeni var athuguð í mismunandi hestafrumuræktum (WB). Lélegri tjáning var á CAT í pcDNA3.1 ferju *in vitro* miðað við VR1012. Því var reynt að bæta tjáningu ferja í hestafrumum.

4.2.1 Hönnun og gerð tjáningaferja

Tafla 8. Tjáningarferjur

	Innskot		Kozak ¹	Intron A
pcDNA3.1/GS+HSA	G	HSA	Partur	
pcDNA3.1/V5-His+HSA	H1	HSA frá pcDNA3.1/GS	Partur	
pcDNA3.1/V5-His/1A+HSA	H2	CMV Intron A frá VR1012	Partur	Intron A
gWIZ+HSA/V5-His	W1	HSA gen og V5-His6 tag frá pcDNA3.1/V5-His		Intron A
gWIZ+HSA/V5-His+K	W2	Kozak og HSA gen og V5-His6 tag frá pcDNA3.1/V5-His	Kozak	Intron A
VR1012+HSA/V5-His	V1	HSA gen og V5-His6 tag frá pcDNA3.1/V5-His		Intron A
VR1012+HSA/V5-His+K	V2	Kozak og HSA gen og V5-His6 tag frá pcDNA3.1/V5-His	Kozak	Intron A

1) Kozak raðir: pcDNA3.1/GS+HSA hefur CACCATG; pcDNA3.1/V5-His+HSA hefur CCATG og gWIZ og VR1012 með Kozak röð hafa GCCACCATG röðina.

Raðgreining á VR1012

Upplýsingar um basaraðir tjáningarferjunnar VR1012, sem gaf betri tjáningu á CAT merkigeninu en pcDNA3.1 í WB í nokkrum hestafrumuræktum, voru af skornum skammti og var einungis gefin upp basaröð skerðisvæðisins (MCS). Til að vera viss um hvaða röð væri að ræða var raðgreint frá skerðisvæðinu fram yfir stýrilinn.

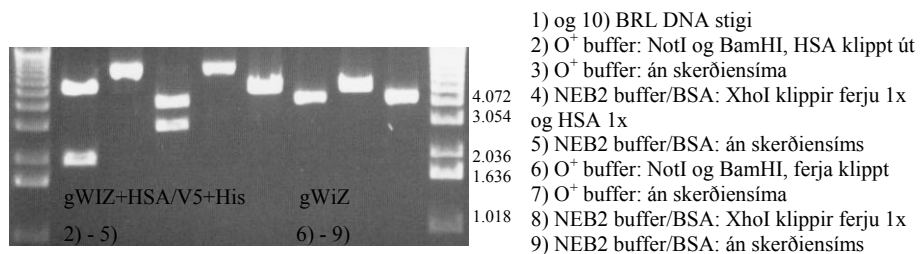
Raðgreindu basaraðirnar voru bornar saman við þekktar raðir á netinu og með því var hægt að sjá um hvaða röð væri að ræða þ.e. CMV-IE stýrill með introni A.

Innsetning intron A

Reynt var að setja inn intron A röðina frá VR1012 fyrir aftan stýrilinn á H1 ferjunni og fyrir framan HSA genið. Hannaðir voru vísar með skerðiseti á hala til að magna upp intron A á VR1012 ferjunni. PCR afurð klippt, hreinsuð og límd inn í klippta H1 ferju og með því búin til pcDNA3.1/V5-His/IA+HSA tjáningarferja (H2).

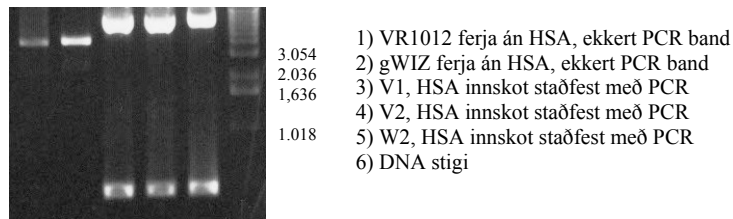
gWIZ og VR1012

Keypt var gWIZ tjáningarferja sem er með CMV-IE stýrilinn og intron A. HSA genið ásamt V5 vakaeiningunni og 6XHis tag var klónað inn í gWIZ og VR1012 ferjurnar með og án Kozak raðar (sjá myndir 11 og 12).



Mynd 11. Staðfesting á HSA innskoti í W1 ferju.

Tóm gWIZ ferja klippt með sömu skerðisímum og notuð sem viðmið. Allar tjáningarferjurnar voru staðfestar með sömu aðferð. PCR bönd rafdrengin á 0,8% agarósageli.



Mynd 12. HSA genið í W2, V1 og V2 ferjunum staðfest með PCR.

PCR gert með WIZHSA_5 vísunum (449 bp). Foreldraferjurnar VR1012 og gWIZ án HSA notaðar sem viðmið. W1 var einnig staðfest með PCR. PCR bönd rafdrengin á 0,8% agarósageli.

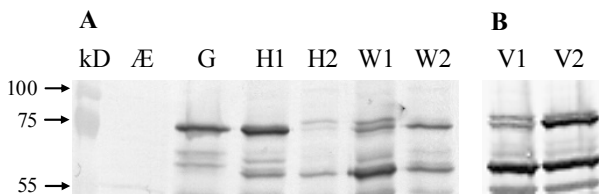
4.2.2 Tjáning ferja athuguð í ónæmisbrykki (WB)

Tjáning á HSA geninu hjá öllum ferjunum var prófuð í COS-7 og ef vel tókst til var tjáningin athuguð í hestafrumum. Samanburður á genaleiðslu með ExGen 500 og Lipofectamine 2000 sýndi að auðveldara væri að sjá mun á milli tjáningu ferja með Lipofectamine 2000. Samanburður á hirðingatíma frumna, 24 og 48 tíma sýndi að

yfirleitt voru G og H1 ferjurnar betur tjáðar eftir 48 tíma en gWIZ og VR1012 HSA ferjurnar með og án Kozak raða voru jafnmikið tjáðar eftir 24 og 48 tíma.

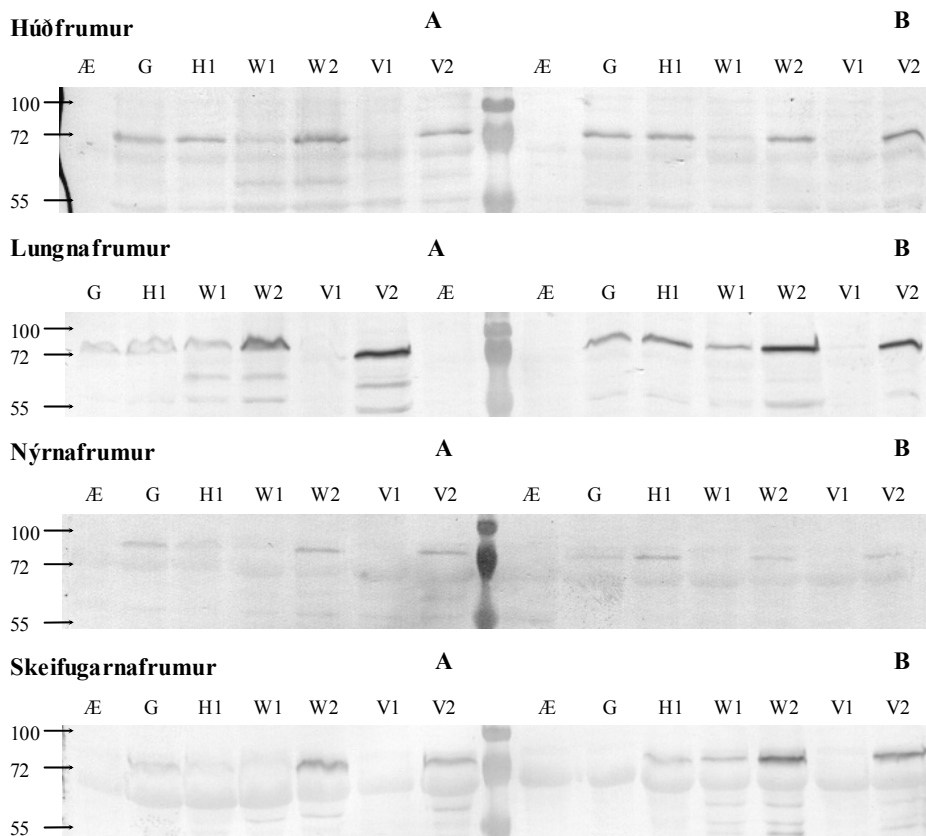
Viðmiðunarferjan pBudCE4.1/lacZ/CAT var notuð til að sjá hvort að svipað magn af DNA væri innlimað í frumurnar og að svipað magn af frumum væri hirt frá hverri holu af bakkanum. Viðmiðunarferjan var genaleidd inní COS-7 frumur með Lipofectamine 2000 og prófuð ein og sér í mismunandi styrk 0,08, 0,17, 0,34, 0,68, 1,35 μg til að meta hvaða styrk best væri að nota. β -galactosidasa virkni var mæld í CPRG prófi og tjáningin skoðuð í WB (anti-V5). β -galactosidasa virknin mældist niður í 0,17 μg en ekki eins vel í 0,08 μg en tjáningin sást vel í WB í öllum þynningunum. Viðmiðunarferjan var einnig genaleidd inn í COS-7 frumur ásamt hinum ferjunum, hverri fyrir sig. Magn viðmiðunarferju var 0,34 μg en hinna 1,01 μg . Góð β -galactosidasa virkni fékkst þar sem viðmiðunarferjan var genaleidd með hinum ferjunum og var mjög góð tjáning á CAT geninu í WB. Ekki var sjáanlegur munur á tjáningu HSA gensins þar sem genaleitt var með viðmiðunarferjunni miðað við tjáningu ferjanna í sama styrk án viðmiðunarferju. Þegar viðmiðunarferjan (0,27 μg) var genaleidd með hinum ferjunum (1,08 μg) í hestafrumuræktirnar fjórar, þá var nánast engin β -galactosidasa virkni mælanleg og frekar léleg tjáning í WB. Ef viðmiðunarferjan var genaleidd ein og sér inn í hestafrumurnar í mismunandi styrk (frá 0,3 – 1,2 μg) mældist lítil sem engin β -galactosidasa virkni en tjáning á CAT geningu sást í WB hjá lungna- og húðfrumum í öllum þynningum en bara í mesta styrk hjá þarmafrumum en engin tjáning í nýrnafrumum. Því var hætt að nota β -galactosidasa virkni og einungis notast við tjáningu CAT gensins sem viðmið í WB.

Tjáning viðmiðunarferjunnar, pBudCE4.1/lacZ/CAT, sýndi að svipað magn af DNA var genaleitt inn í frumurnar og að svipað magn af frumum voru hirtar úr hverri holu af bakkanum.



Mynd 13. Tjáning HSA gens í COS-7 frumum.

Frumurnar voru genaleiddar með HSA tjáningarferjunum með Lipofectamine 2000, ræktaðar í 48 tíma, hirtar og tjáning skoðuð í ónæmisþrykki. Viðmiðunarfrumur (Æ) voru meðhöndlaðar eins án DNA. (A) HSA tjáningarferjur: pcDNA3.1/GS (G), pcDNA3.1/V5-His (H1), pcDNA3.1/V5-His með intron A (H2), gWIZ (W1) og gWIZ með Kozak (W2). (B) HSA tjáningarferjur: VR1012 (V1) og VR1012 með Kozak (V2). HSA próteinið er um 75 kDa.



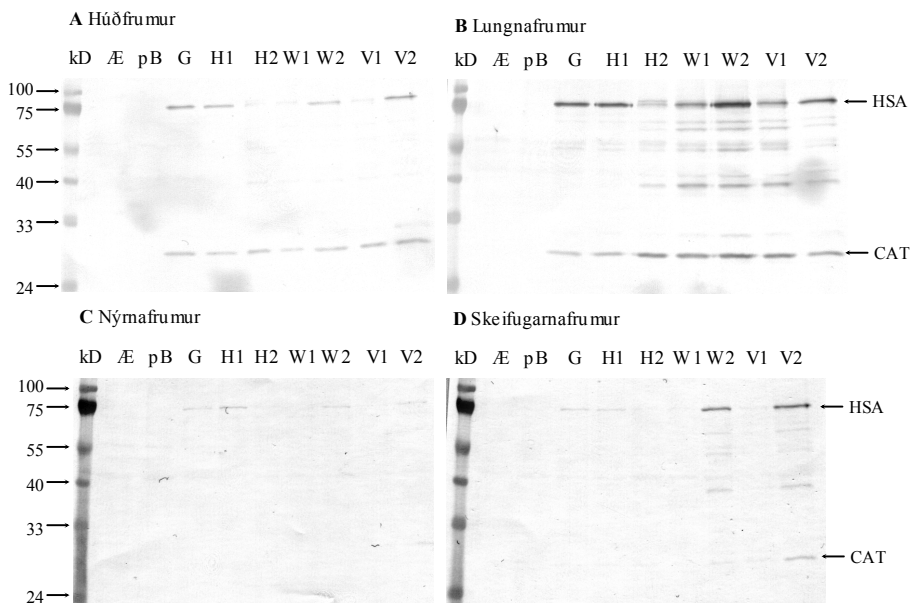
Mynd 14. Tjáning á HSA geni í hestafrumum af mismunandi uppruna.

Frumurnar voru genaleiddar með HSA ferjum með Lipofectamine 2000, hafðar í frumuræktunarskáp í 24 (A) og 48 (B) tíma, hirtar og tjáning skoðuð í ónæmisþrykki. Viðmiðunarfrumur (Æ) voru meðhöndlaðar á sama hátt en án DNA. HSA tjáningarferjurnar eru: pcDNA3.1/GS (G), pcDNA3.1/V5-His (H1), gWIZ (W1), gWIZ með Kozak (W2), VR1012 (V1) og VR1012 með Kozak (V2). HSA próteinið er um 75 kDa. VR1012 með Kozak (V2) tjáði ekki HSA genið í þessari tilraun. pcDNA3.1/GS (G) var ekki genaleitt í 48 tíma hjá skeifugarnafrumunum og kemur þar af leiðandi ekki fram í WB.

Áhrif Kozak raðar

Tjáningarferjurnar sem höfðu verið prófaðar *in vivo* hafa hluta af dæmigerðri Kozak röð, pcDNA3.1/GS+HSA (G) hefur CACCATG og pcDNA3.1/V5-His+HSA (H1) hefur CCATG. Þær voru vel tjáðar í COS-7 frumum (sjá mynd 13) og hestlungnafrumum en minna tjáðar í húðfrumum og lítið tjáðar í nýrna- og skeifugarnafrumum (sjá myndir 14 og 15). Heil Kozak röð, GCCACCATG, var innlimuð inn í tvær tjáningarferjur sem innihéldu intron A röðina, gWIZ og VR1012. Kozak röðin hafði ekki mikil áhrif í COS-7 frumunum miðað við ferjurnar sem voru

eins nema án Kozak raðar. VR1012+HSA/V5-His+K (V2) sýndi aðeins meiri tjáningu en gWIZ+HSA/V5-His+K (W2) sýndi aðeins minni tjáningu en ferjurnar án Kozak (sjá mynd 13). gWIZ+HSA/V5-His (W1) og VR1012+HSA/V5-His (V1) (án Kozak) voru tjáðar í litlu mæli í frumum úr lungum og í mjög litlu mæli í húð-, nýrna- og skeifugarnafrumum (sjá myndir 14 og 15). Mun mátti sjá hjá W2 og V2 þar sem Kozak röðin jók tjáningu í öllum fjórum hestafrumuræktunum. Í hesta-, lungna- og nýrnafrumum var tjáningin svipuð og hjá G og H1 ferjunum en í skeifugarnafrumunum var tjáning á HSA meiri (sjá myndir 14 og 15).



Mynd 15. Tjáning á HSA geni í hestafrumum af mismunandi uppruna.

Frumurnar voru genaleiddar með HSA ferjum og pBudCE4.1/lacZ/CAT viðmiðunarferju með Lipofectamine 2000, hafðar í frumuræktunarskáp í 48 tíma, hirtar og tjáning skoðuð í WB. Viðmiðunarfrumur (Æ) voru meðhöndlaðar á sama hátt en án DNA. HSA tjáningarferjurnar eru: pcDNA3.1/GS (G), pcDNA3.1/V5-His (H1), pcDNA3.1/V5-His með intron A (H2), gWIZ (W1), gWIZ með Kozak (W2), VR1012 (V1) og VR1012 með Kozak (V2). HSA próteinið er um 75 kDa og CAT próteinið um 30 kD. Tjáning viðmiðunarferjunnar, pBudCE4.1/lacZ/CAT, sýndi að svipað magn af DNA var genaleitt inn í frumurnar og að svipað magn af frumum voru hirtar úr hverri holu af bakkanum. Viðmiðunarferjan var einnig genaleidd ein og sér í 0,27 µg (pB).

Áhrif intron A raðar

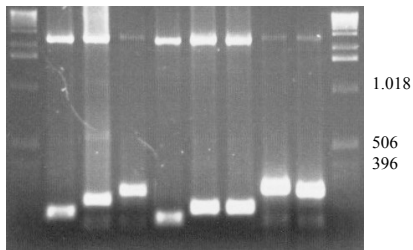
G og H1 tjáningarferjurnar innihalda ekki intron A röðina og voru tjáðar í svipuðu mæli í öllum frumuræktunum. Með því að klóna intron A röðina inn í H1 ferjuna til að búa til H2 fékkst minni tjáning í COS-7 frumunum (mynd 13) og í öllum fjórum hestafrumuræktunum miðað við foreldraferjuna (mynd 15). W1 og V1 (án Kozak) sýndu minni tjáningu en G og H1 í öllum frumuræktunum þrátt fyrir intron A. W2 og V2 (með Kozak) sem hafa intron A sýndu svipaða tjáningu eða meiri tjáningu og G og H1 í hestafrumuræktunum (mynd 14 og 15) en svipaða eða minni tjáningu í COS-7 frumum (mynd 13).

4.3 Prófun á CpG röðum og peptíðum sem örva ónæmissvörun hesta

Sýnt hefur verið fram á að viss peptíð og ákveðnar ómetyleraðar kirnaraðir úr bakteríum (CpG stef) geta virkað sem Th1 ónæmisglæðar. Það CpG stef sem hefur virkað best í hestum, GTCGTT (Krieg, 2002) verður hér eftir kallað hestastef og það sem hefur virkað best í músum, GACGTT (Krieg, 2002) verður hér eftir kallað músastef.

4.3.1 Leit að CpG röðum sem örva ónæmissvörun hesta

Gerðir voru nokkrir klónar af bluescriptferjunni með mismörgum eintökum af CpG stefjunum (2-16 auka CpG) sem var staðfest með blá/hvítri skimun og PCR á bakteríuþyrpingum.

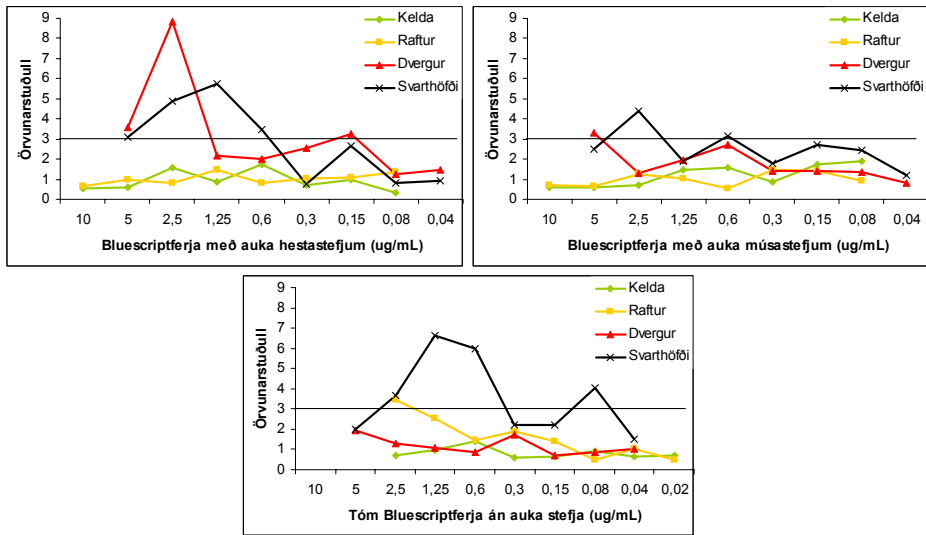


- 1) BRL DNA stigi
- 2) Bluescriptferja með 1 innskoti, 2 CpG stef
- 3) Bluescriptferja með 3 innskotum, 6 CpG stef
- 4) Bluescriptferja með 4 innskotum, 8 CpG stef
- 5) Bluescriptferja með engu innskoti, BT
- 6) Bluescriptferja með 2 innskoti, 4 CpG stef, BH4
- 7) Bluescriptferja með 2 innskoti, 4 CpG stef, BM4
- 8) Bluescriptferja með 4 innskoti, 8 CpG stef, BH8
- 9) Bluescriptferja með 4 innskoti, 8 CpG stef, BM8
- 10) BRL DNA stigi

Mynd 16. PCR á bluescriptferjum með mismörg innskot af CpG röðum.

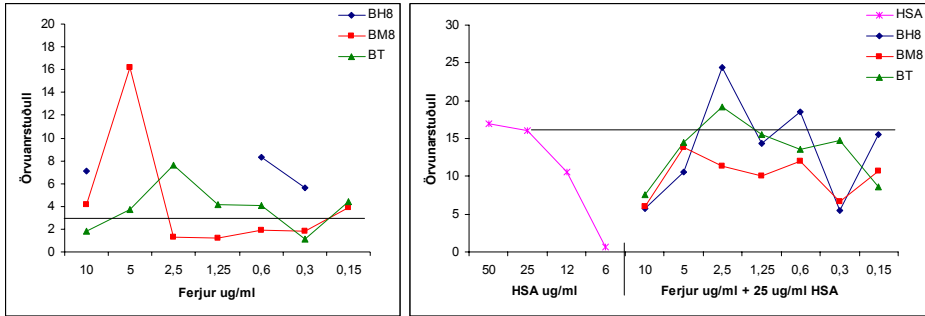
PCR bönd rafðregin á 1,5% agarósageli.

Þrjár bluescriptferjur voru ræktaðar og einangraðar með “midiprep” setti (QIAGEN) og prófaðar í eítílfrumufjölgunarprófi. Einangraðar voru tvær ferjur með CpG stefjum, annars vegar með átta hesta CpG stefjum (BH8) og hins vegar með átta músa CpG stefjum (BM8) og einnig tóm bluescriptferja (BT). Fjölgunarpróf á eítílfrumum frá fjórum hestum var gert þar sem örvað var með ferjunum í mismunandi styrk (sjá mynd 17). Bluescriptferja með auka hestastef örvaði tvo af fjórum hestum. Bluescriptferja með auka músastefjum örvaði lítið sem ekkert. Tóm bluescriptferja án auka CpG stefja örvaði í einum af fjórum hestum.



Mynd 17. Eítílfrumufjölgunarpróf, örvun með raðþynntum bluescriptferjum.

Eítílfrumufjölgunarpróf var gert á HSA sprautuðum hesti þar sem örvað var með ferjunum með og án HSA vaka. Tóm bluescriptferja og ferja með hestastefjunum örvaði smávegis umfram HSA en ekki ferja með músastefjunum. Ferjan með músastefjunum örvaði ein og sér við 5 µg/ml. Tóma bluescriptferjan og ferjan með hestastefjunum örvuðu lítilsháttar einar og sér (sjá mynd 18).

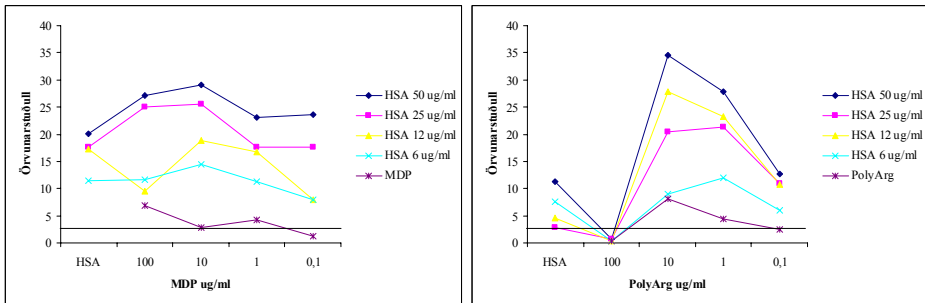


Mynd 18. Eitilfrumufjölgunarpróf, örvun með bluescriptferjum með og án vaka.

Eitilfrumur einangraðar úr Kalla 16 vikum eftir húðpróf (v. 27). Af tæknilegum ástæðum náðust ekki allar mælingar í plötunni án HSA með ferjunni með hestastefjunum (BH8) og er þeim punktum sleppt. BH8: Bluescriptferja með 8 hestastefjum, BM8: Bluescriptferja með 8 músastefjum og BT: Bluescriptferja án auka CpG stefja.

4.3.2 Prófað að örva ónæmissvörun hesta með peptíðunum, pR og MDP

Sýnt hefur verið fram á að viss peptíð geta virkað sem Th1 ónæmisglæðar. Prófað var hvort Polyarginine (PA) og Muramyl dipeptid (MDP) örvi nægilega kröftugt Th1 svar í hestahvítfrumum *in vitro* til að grundvöllur sé fyrir því að prófa þau *in vivo*.



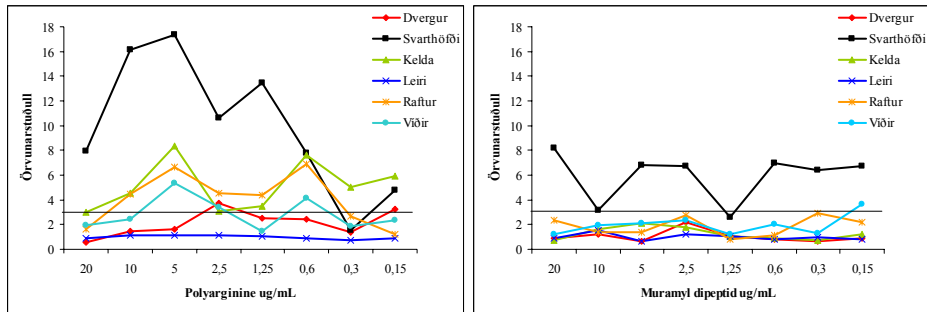
Mynd 19. Eitilfrumufjölgun, með raðþynningum af peptíðunum með og án HSA.

Eitilfrumur einangraðar úr Kalla 8 vikum eftir húðpróf (v. 19).

Gerð var raðþynning með peptíðunum (100 – 0,1 $\mu\text{g/ml}$) og prófað á eitilfrumum HSA sprautaðs hests ásamt raðþynntum vaka (HSA 50 – 6 $\mu\text{g/ml}$) og var örvun mæld í eitilfrumufjölgunarprófi. MDP örvaði ekki frumufjölgun eitt og sér nema í miklum styrk (100 $\mu\text{g/ml}$) og með HSA vaka mátti sjá örvun í tveim efstu HSA þynningunum (með 10 – 100 $\mu\text{g/ml}$ af MDP) en örvunin var yfirleitt ekki miklu meiri en HSA vakinn gaf einn og sér. PR í 100 $\mu\text{g/ml}$ styrk hafði eituráhrif og drap

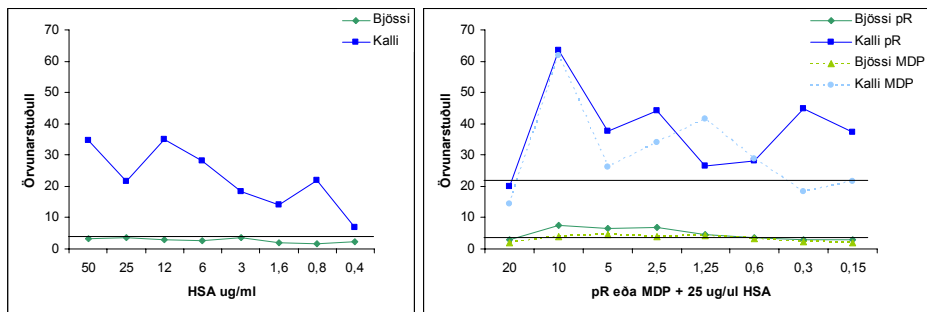
frumurnar, 10 µg/ml af pR örvaði eitt og sér og í 1 – 10 µg/ml styrk með HSA vaka fékkst meiri örvun en með HSA vakanum einum og sér (sjá mynd 19).

Eitilfrumufjölunarpróf var gert á sex hestum með pR og MDP peptíðunum einum og sér. Örvun mældist hjá fjórum hestum með pR (0,6 – 10 µg/ml). Engin örvun var mælanleg með MDP nema lítilsháttar örvun hjá einum hesti (mynd 20).



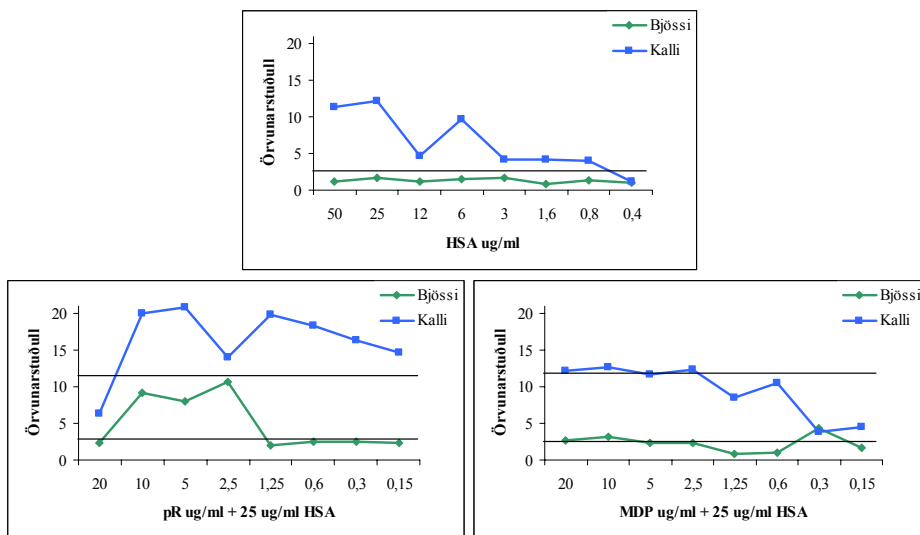
Mynd 20. Eitilfrumufjölun, örvun með peptíðum.

Eitilfrumufjölunarpróf var gert á HSA/Alum sprautuðum hestum. Lítil sem engin örvun mældist hjá Bjössu en viðmiðið var óvenju hátt (um 1.000 cpm) í tveimur prófum (v. 21 og v. 23). Mikil örvun mældist hjá Kalla en bæði pR og MDP með HSA örvaðu umfram það sem HSA örvaði eitt og sér og komu bæði peptíðin best út í 10 µg/ml styrkinum. 20 µg/ml af pR styrk hafði eituráhrif á frumurnar (sjá mynd 21).



Mynd 21. Eitilfrumufjölun, örvun með peptíðum og HSA.

Eitilfrumur úr Bjössu og Kalla 10 vikum eftir húðpróf (v. 21).

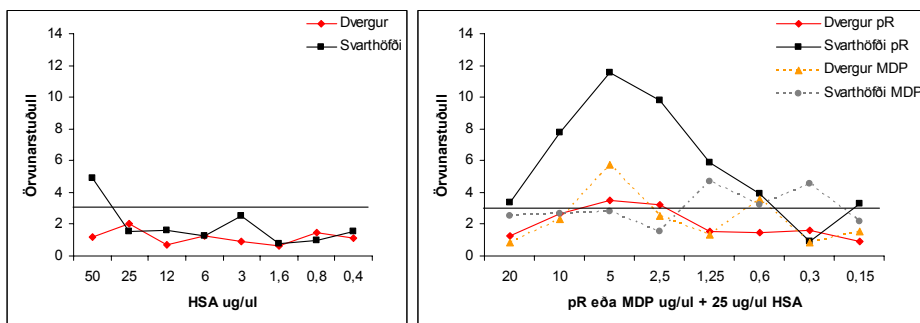


Mynd 22. Eitilfrumufjölgun, örvun með peptíðum og HSA.

Eitilfrumur úr Bjössla og Kalla 14 vikum eftir húðpróf (v. 25).

Eitilfrumufjölgunarpróf var endurtekið á sömu hestum mánuði seinna. PR örvaði eitilfrumur úr báðum hestunum með HSA vakanum en ekki MDP (mynd 22).

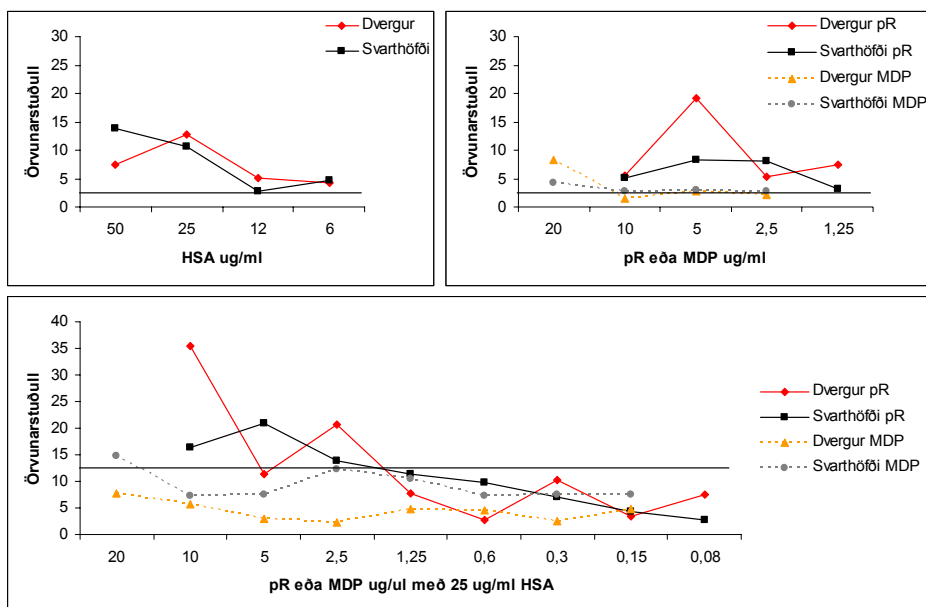
Eitilfrumufjölgunarpróf var gert á HSA/MPL sprautuðum hestum. Örvað með HSA einu og sér í og með peptíðunum í raðþynningu með 25 µg/ml af HSA. PR með vaka örvaði eitilfrumur úr Svarthöfða en ekki Dverg. MDP örvaði ekki frumurnar úr hestunum. HSA vakinn örvaði ekki frumurnar úr hestunum (sjá mynd 23).



Mynd 23. Eitilfrumufjölgun, örvun með peptíðum og HSA.

Eitilfrumur úr Dverg og Svarthöfða 5 vikum eftir fyrstu bólusetningu.

Eitilfrumufjölunarpróf var endurtekið á sömu hestum mánuði seinna. Örvað með HSA í raðþynningu, með peptíðunum í raðþynningu og með peptíðunum í raðþynningu með 25 µg/ml af HSA. Þegar örvað var með HSA einu og sér var örvunarstuðullinn hjá báðum hestunum um 11-13 við 25 µg/ml þynninguna. PR eitt og sér örvaði eitilfrumurnar hjá báðum hestunum en 10 µg/ml hafði eituráhrif. PR með vaka örvaði frumurnar umfram það sem vakinn örvaði í 5 – 2,5 µg/ml styrk. MDP örvaði ekki frumurnar eitt og sér (aðeins í 20 µg/ml) né með vaka (mynd 24).



Mynd 24. Eitilfrumufjölun, örvun með peptíðum með og án HSA.

Eitilfrumur úr Dverg og Svarthöfða 4 vikum eftir seinni bólusetninguna (v. 10).

Tafla 9. Samantekt á frumufjölunarniðurstöðum.

+ merkir örvun, (+) léleg örvun, - engin örvun. Hestar 1-4 eru hestar á Keldum sem ekki hafa verið bólusettir með HSA. Próf voru endurtekin misoft og ekki öll sýnd í niðurstöðukaflanum (eitt tákni fyrir hvert próf). Eitilfrumufjölunarpróf úr Dverg og Svarthöfða 5. viku eftir 1. bólusetningu ekki tekið með í töflu vegna lélegra HSA örvunar.

Hestar	Peptíð eitt og sér								Peptíð með HSA			
	Kalli	Dvergur	Svarthöfði	1	2	3	4	Bjösssi	Kalli	Dvergur	Svarthöfði	
pR	+	--+	+++	+	-	+	+	(+)	(+)	+	+	
MDP	(+)	---	+-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	

PR virkaði best 2-5 µg/ml en hafði eituráhrif 20-100 µg/ml. PR örvaði eitilfrumur úr 5 af 7 hestum eitt og sér og jók vakaörvun. MDP örvaði ekki eitt og sér og jók ekki vakaörvun sem var endurtakanleg (sjá samantekt í töflu 9).

4.3.3 TNF- α og IFN- γ framleiðsla við örvun CpG raða og peptíða

TNF- α og IFN- γ framleiðsla hvítfrumna úr hestum sem örvaðar voru með CpG röðum og peptíðum var athuguð með áherslu á TNF- α framleiðslu.

Ræktun á bakteríum ummynduðum með ferjum með 8-10 CpG stefnum gekk mjög illa og virtust þessi stærri innskot vera eitruð. Mun minna ferju DNA fékkst til prófunar úr þessum ræktum (sjá töflu 10).

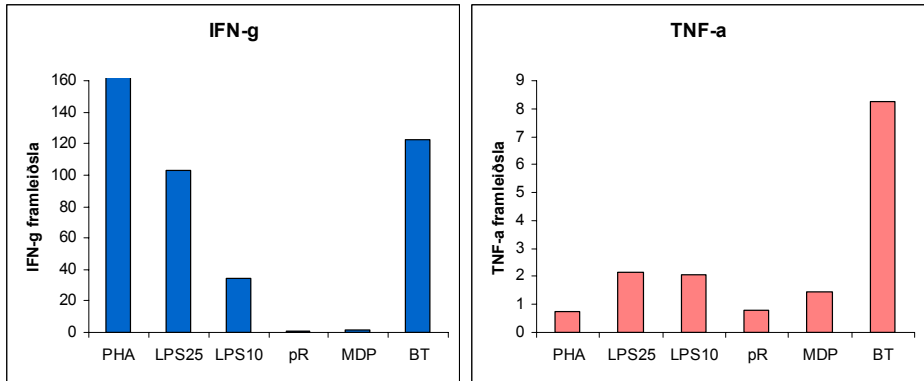
Tafla 10. Ferjur.

Einangrað með EndoFree Plasmid Mega setti frá QIAGEN.

Nafn	Viðbætt CpG stef	Heildarfjöldi CpG stefja	Hreinsuð ferja, ng/µl
BT		1 músa og 3 hesta	4.000
BH4	4 hesta	1 músa og 7 hesta	2.250
BH8	8 hesta	1 músa og 11 hesta	100
BH10	10 hesta	1 músa og 13 hesta	-
BM4	4 músa	5 músa og 3 hesta	2.200
BM8	8 músa	9 músa og 3 hesta	170
BM10	10 músa	11 músa og 3 hesta	-
gWIZ		1 músa og 2 hesta	1.850

Frumuörvun var sett upp þar sem fylgst var með örvun eitilfrumna með LPS í smásjá. Örvun var sjáanleg eftir 2 daga í fyrstu þrem þynningunum af LPS (100, 50, 25 µg/ml) og þar mátti sjá stórar frumu (líklega átfrumur) með margar minni frumur í kringum sig (klumpun). Fjórum dögum seinna sást örvun í öllum þynningum (100 – 0,08 µg/µl) og stóru frumurnar ekki eins áberandi. Á fimmta degi fóru frumur að drepast.

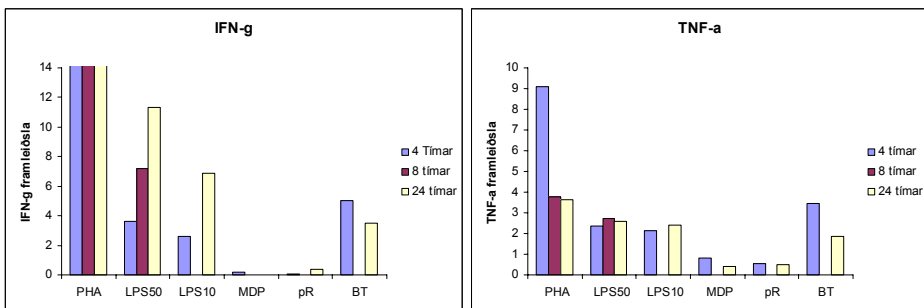
Hvítfrumur voru einangraðar úr hesti (Jakob) og örvaðar með PHA, LPS, pR, MDP og BT. Frumur voru hirtar eftir sólahrings örvun og mæld tjáning β -actins, IFN- γ og TNF- α . BT ferja örvaði TNF- α framleiðslu í meira magni en jákvæða viðmiðið, LPS. Einnig örvaði BT ferjan meiri IFN- γ tjáningu heldur en LPS. Lítil sem engin örvun á boðefnaframleiðslu vegna peptíða var mælanleg (sjá mynd 25).



Mynd 25. Boðefnaframleiðsla, örvun með peptíðum og ferju.

Blóð tekið úr hesti (Jakob) og hvítfrumur einangraðar og örvaðar með PHA 1 µg/ml, LPS 25 og 10 µg/ml, pR og MDP 5 µg/ml og tómri Bluescriptferju 2 µg/ml. 5×10^6 fr í 1,5 ml æti í 24 holu bakka. Frumur hirtar eftir 24 tíma. IFN- γ framleiðsla PHA í raun miklu meiri (920 eintök framleiddar) en það var klippt ofan af grafínu.

Örvun hvítfrumna var endurtekin með sama efnivið nema notaður hærri styrkur af LPS og frumur hirtar eftir 4, 8 og 24 tíma. Samkvæmt PHA örvun og örvun með tómri bluescriptferju var meiri TNF- α framleiðsla eftir 4 tíma, heldur en eftir 8 tíma eða 24 tíma. Ekki fékkst meiri TNF- α framleiðsla með hærri LPS styrk (sjá mynd 26).

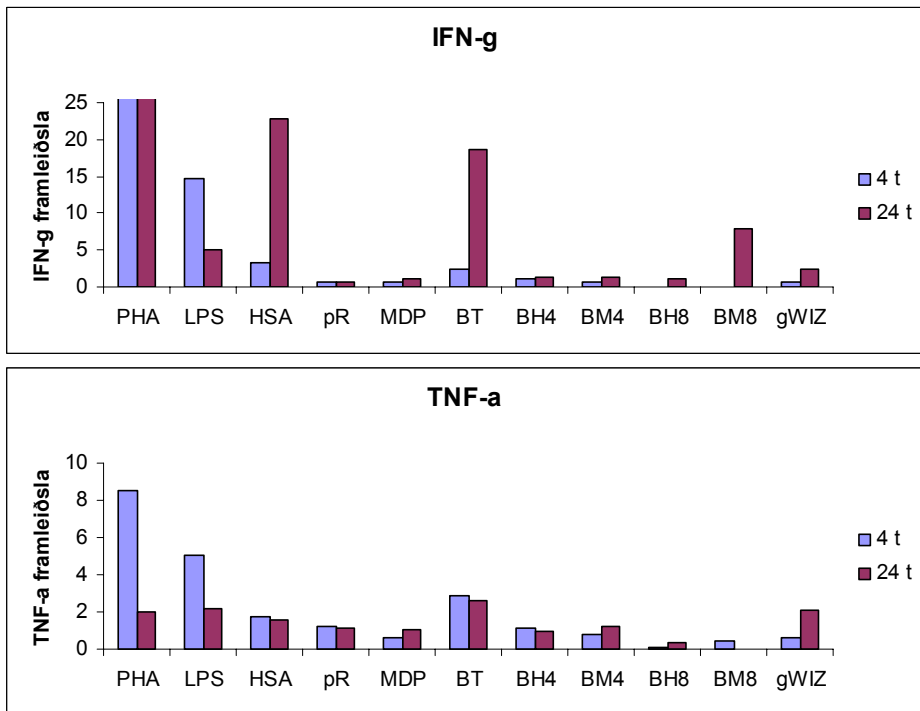


Mynd 26. Boðefnaframleiðsla, örvun með peptíðum og ferju.

Blóð tekið úr hesti (Jakob) og hvítfrumur einangraðar og örvaðar með PHA 1 µg/ml, LPS 50 og 10 µg/ml, pR og MDP 5 µg/ml og tómri bluescriptferju 2 µg/ml. 5×10^6 fr í 1,5 ml æti í 24 holu bakka. Frumur hirtar eftir 4, 8 og 24 tíma. Í 8 tíma örvuninni var aðeins notað mítógenin PHA og LPS 50 µg/ml. IFN- γ framleiðsla PHA í raun miklu meiri en það var klippt ofan af grafínu, 91 eintök framleidd eftir 4 tíma, 56 eftir 8 tíma og 924 eftir 24 tíma.

Hvítfrumur voru einangraðar úr hesti (Svala) og örvaðar með PHA, LPS, pR, MDP, HSA, BT, BH4, BM4, BH8, BM8 og gWIZ. Frumur voru hirtar eftir 4 og 24 tíma örvun og mæld framleiðsla β -actins, IFN- γ og TNF- α .

LPS, jákvæða viðmiðið, framleiddi minna af TNF- α en PHA. IFN- γ framleiðsla við örvun LPS lækkar eftir 24 tíma (hækkaði hjá Jakobi). PHA örvaði IFN- γ framleiðslu mjög vel og einnig TNF- α eftir 4 klst. Þegar frumuræktir voru skoðaðar í smásjá sást greinilega örvun í brunnunum, stórar frumur með minni frumur í kring (klumpun) strax eftir 4 tíma. Í frumuræktunarbrunnunum með PHA sást greinilega örvun frumna eða klumpun eftir 4 tíma. Þegar frumuræktunarbakkar voru skoðaðir eftir hirðingu frumna sáust frumur sem sátu eftir fastar við plastið.



Mynd 27. Boðefnaframleiðsla, örvun með peptíðum og ferju.

Hvítfrumur einangraðar úr hesti (Svala). Örvað með PHA 1 μ g/ml, LPS 50 μ g/ml, HSA 100 μ g/ml, pR 5 μ g/ml, MDP 5 μ g/ml og með ferjunum BT, BH4, BM4, BH8, BM8 og gWIZ í 2 μ g/ml. Frumur hirtar eftir 4 og 24 tíma. IFN- γ framleiðsla PHA svo mikil að það var skorið ofan af grafinu en fjöldi IFN- γ eftir 4 tíma var 148 og 269 eftir 24 tíma. Framleiðsla TNF- α í 4 tíma viðmiðinu var mjög hátt, það var eitthvað sem örvaði í ætíu.

Tóma bluescriptferjan örvaði meiri boðefnaframleiðslu en ferjur með auka CpG stefnum. Tóma bluescriptferjan örvaði IFN- γ framleiðslu eftir 24 tíma og smávægis TNF- α eftir 4 og 24 tíma. Ferjurnar með 4 stefnum örvuðu ekki mikla boðefnaframleiðslu og enn minna með átta stefnum nema BM8 örvaði smá IFN- γ framleiðslu (mynd 27). gWis ferjan örvaði ekki mikla boðefnaframleiðslu en lítilsháttar TNF- α framleiðslu mátti sjá eftir 24 tíma (mynd 27). Þegar fylgst var með frumuræktunum í smásjá sást örvun í brunnunum hjá öllum ferjunum líkt og hjá LPS eftir 4 tíma og einnig eftir 24 tíma.

PR og MDP örvuðu ekki ein og sér, hvorki myndun IFN- γ né TNF- α . Þegar frumuræktirnar voru skoðaðar í smásjá sást greinilega örvun í pR brunnunum líkt og hjá PHA, þ.e. örvun (klumpun án stóru frumnanna) strax eftir 4 tíma og eftir 24 tíma var vart við eituráhrif. Hjá MDP sást engin örvun eftir 4 tíma en það sást svipuð örvun og hjá LPS eftir 24 tíma, þ.e. örvun með stórum frumum.

HSA örvaði IFN- γ myndun eftir 24 tíma en ekki TNF- α (mynd 27). Þegar fylgst var með frumuræktunum í smásjá sást smá örvun í brunnunum eftir 24 tíma en ekki eftir 4 tíma.

4.4 *In vivo* tilraun til að Th1 stýra ónæmissvari hjá hestum með Monophosphoryl-lipid A (MPL) glæði

Sprautaðir voru 4 hestar með HSA próteini og MPL Th1 stýrandi glæði (HSA/MPL hestar) þrisvar sinnum i.m. og s.c. (viku 0, 6 and 52). Til samanburðar voru sprautaðir 2 hestar með HSA próteini og alum glæði (HSA/Alum hestar) tvisvar undir húð (v.0 og v. 129) og gert á þeim húðpróf (v. 11). Sjá töflu um hestana í kafla 3.1 og aðgerðir í viðauka A.

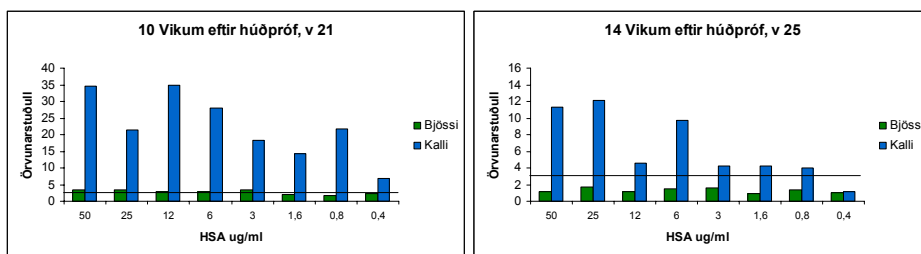
4.4.1 HSA sértæk eitilfrumufjölgun hjá hestum bólusettum með HSA/Alum og HSA/MPL

Eitilfrumur voru einangraðar úr hestunum sem höfðu verið bólusettir með HSA próteini og alum glæði eða MPL glæði og gert eitilfrumufjölgunarpróf á mismunandi tímamörkum. Gerð var raðþynging með HSA vakanum.

Annar af hestunum tveim (Kalli) sem sprautaðir voru með HSA próteini og alum glæði svaraði kröftuglega í eitilfrumufjölgunarprófi við HSA örvun. Gerð voru

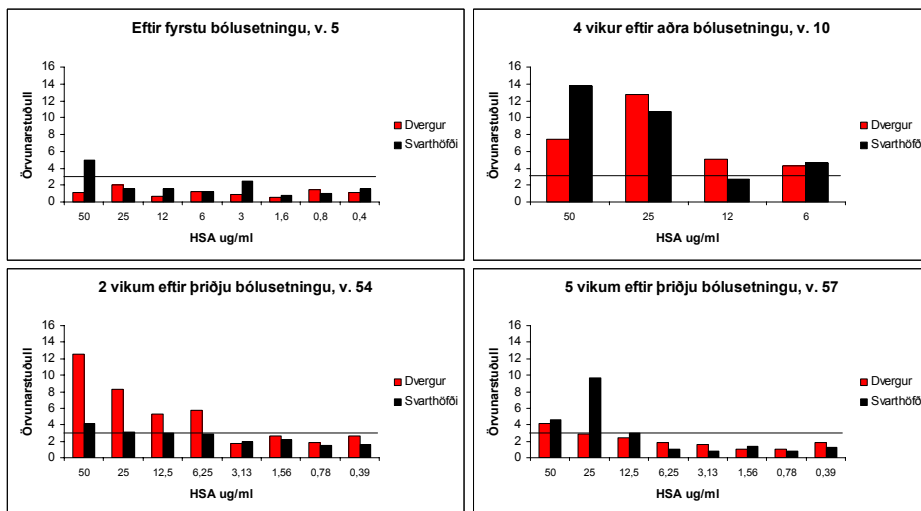
eitilfrumufjölunarpróf með HSA vakanum einum og sér í raðþynningu 8, 10, 14 og 16 viku eftir húðpróf (mynd 28) en 8 og 27 vikum eftir húðpróf var aðeins gerð örvun á frumu úr Kalla (niðurstöður ekki sýndar). Örvunarstuðullinn var lágur hjá Bjössu en viðmiðið var mjög hátt.

Hestarnir sem sprautaðir voru með HSA próteini og MPL glæði gáfu lágt svar í eitilfrumufjölunarprófi með HSA vaka eftir fyrstu bólusetninguna, próf gerð viku 2, 3 (niðurstöður ekki sýndar) og 5 (myndir 29 og 30). Eftir aðra bólusetningu kom fram smá örvun hjá Jakobi og Svala í viku 8 (mynd 30) og hjá Dvergi og Svarthöfða í viku 10 (mynd 29). Eftir þriðju bólusetningu hjá Dvergi og Svarthöfða (vika 54 og 57) sýndi eitilfrumufjölunarpróf með HSA vaka smá örvun (mynd 29).

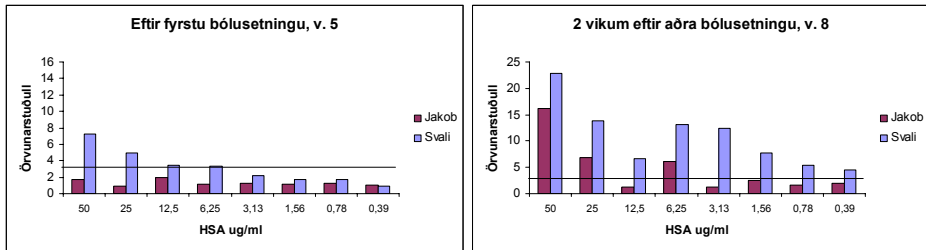


Mynd 28. Eitilfrumufjölun, HSA örvun á hvítfrumum HSA/Alum hesta.

Athuga mun á skala.



Mynd 29. Eitilfrumufjölun, HSA örvun á hvítfrumum HSA/MPL hesta.



Mynd 30. Eitilfrumufjölgun, HSA örvun á hvítfrumum HSA/MPL hesta.

Athuga mun á skala.

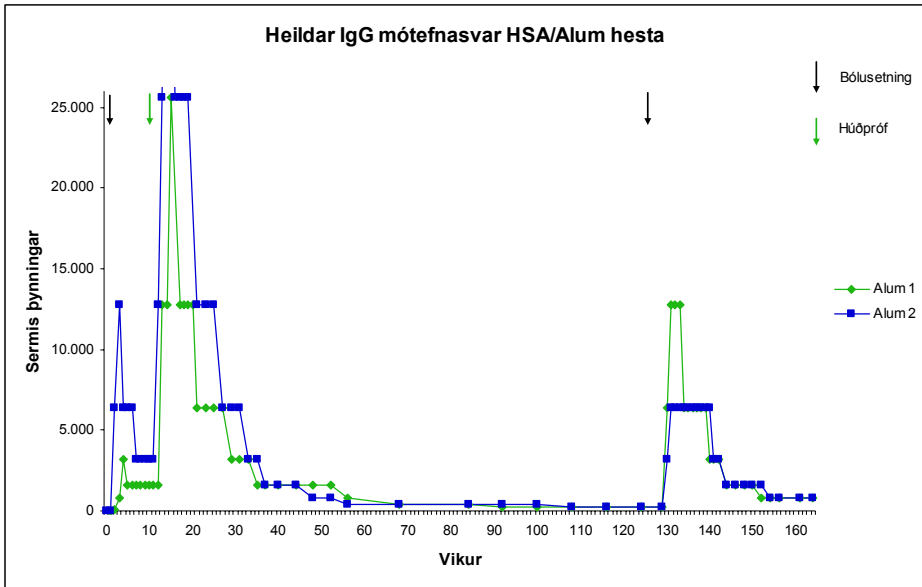
4.4.2 Mótefnasvörun hjá hestum bólusettum með HSA/Alum og HSA/MPL

Bjösssi (Alum 1) og Kalli (Alum 2) voru notaðir sem samanburðarhestar en það var framkallað ofnæmi í þeim með því að sprauta þá með HSA próteini í alum ónæmisglæði undir húð. Sýnt var fram að þeir hefðu myndað ofnæmi með húðprófi og með því að mæla HSA sérvirk IgE mótefni (mynd 33). Hestarnir svöruðu kröftulega með IgG(T) undirflokka svari en nokkuð lægra IgGa og mun lægra IgGb svari (mynd 35).

IgG undirflokkað svör voru skoðuð hjá Alum hestunum á mismunandi tíma, þ.e. 2 og 3 vikum eftir fyrstu bólusetningu, 2 vikur eftir húðpróf og 2 vikur eftir seinni bólusetningu. Svipuð svör sáust í IgGa og IgGb mótefnamælingunum 2. og 3. vikuna eftir fyrstu bólusetninguna en IgG(T) hækkaði töluvert milli vikna (niðurstöður ekki sýndar). IgGa, IgGb og IgG(T) mótefnasvörin hækkuðu eftir húðpróf og voru svipuð eftir 2. bólusetningu (mynd 35).

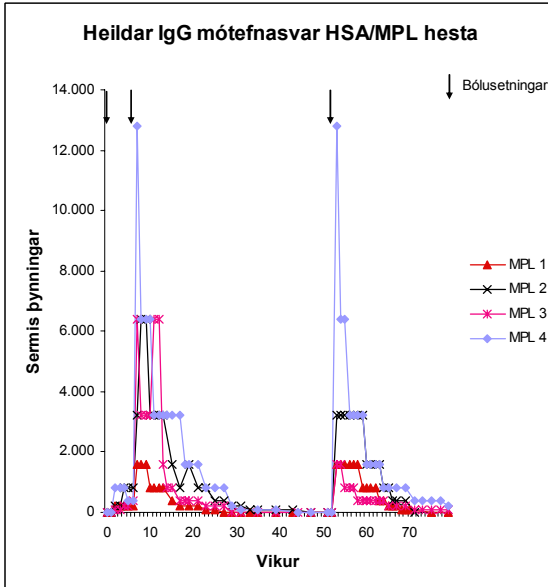
Dvergur (MPL 1), Svarthöfði (MPL 2), Jakob (MPL 3) og Svail (MPL 4) voru sprautaðir með HSA próteini í MPL ónæmisstýrandi glæði þrisvar sinnum. MPL hestarnir framleiddu einnig IgE en svarið dvínaði fljótt (mynd 34). Hestarnir svöruðu kröftulega með IgG(T) svari en minna mældist af IgGa og IgGb (mynd 35).

Gerðar voru IgG undirflokkað mælingar á mismunandi tíma hjá MPL hestunum, þ.e. 2 og 3 vikum eftir 2. bólusetningu og 2 og 3 vikum eftir 3. bólusetningu. Bornar voru saman IgG undirflokkað mælingar hjá Dverg og Svarthöfða 2 og 3 vikum eftir aðra bólusetningu og kom í ljós að IgG undirflokka mótefnasvörin minnka aðeins eftir 3 vikur en IgGa, IgGb og IgG(T) hlutföllin haldast þau sömu. Það sama var upp á teningnum þegar bornar voru saman IgG undirflokkað mælingar hjá Jakobi og Svaila 2



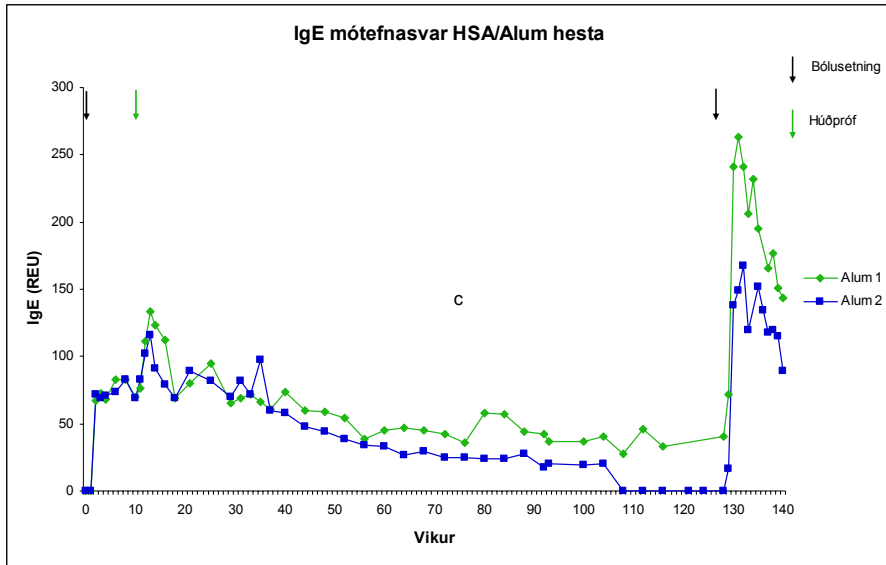
Mynd 31. Heildar IgG mótefnasvar hjá HSA/Alum hestum.

Alum 1 er Bjóssi og Alum 2 er Kalli. Húðpróf var gert á viku 11 og endurbólusett viku 129. Skorið ofan af grafinu en Kalli mældist í viku 14 51.200 (ekki sami skali á mynd 31 og 32).



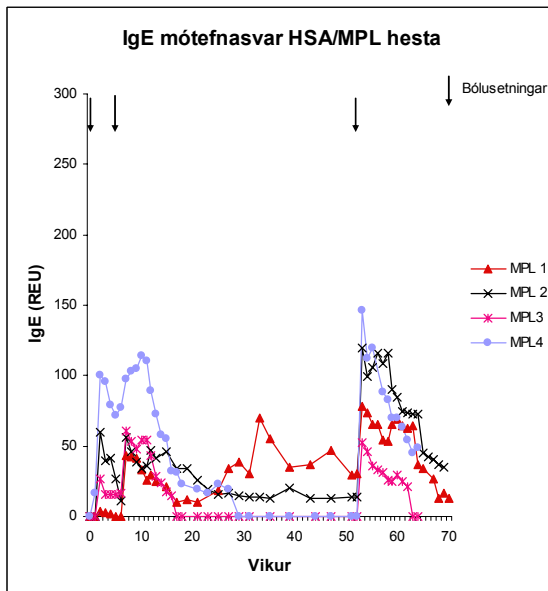
Mynd 32. Heildar IgG mótefnasvar hjá HSA/MPL hestum.

MPL 1 er Dvergur, MPL 2 er Svarthöfði, MPL 3 er Jakob og MPL 4 er Svali. Framkvæmdar voru 3 bólusetningar, viku 0, 6 og 52 (ekki sami skali á mynd 31 og 32).



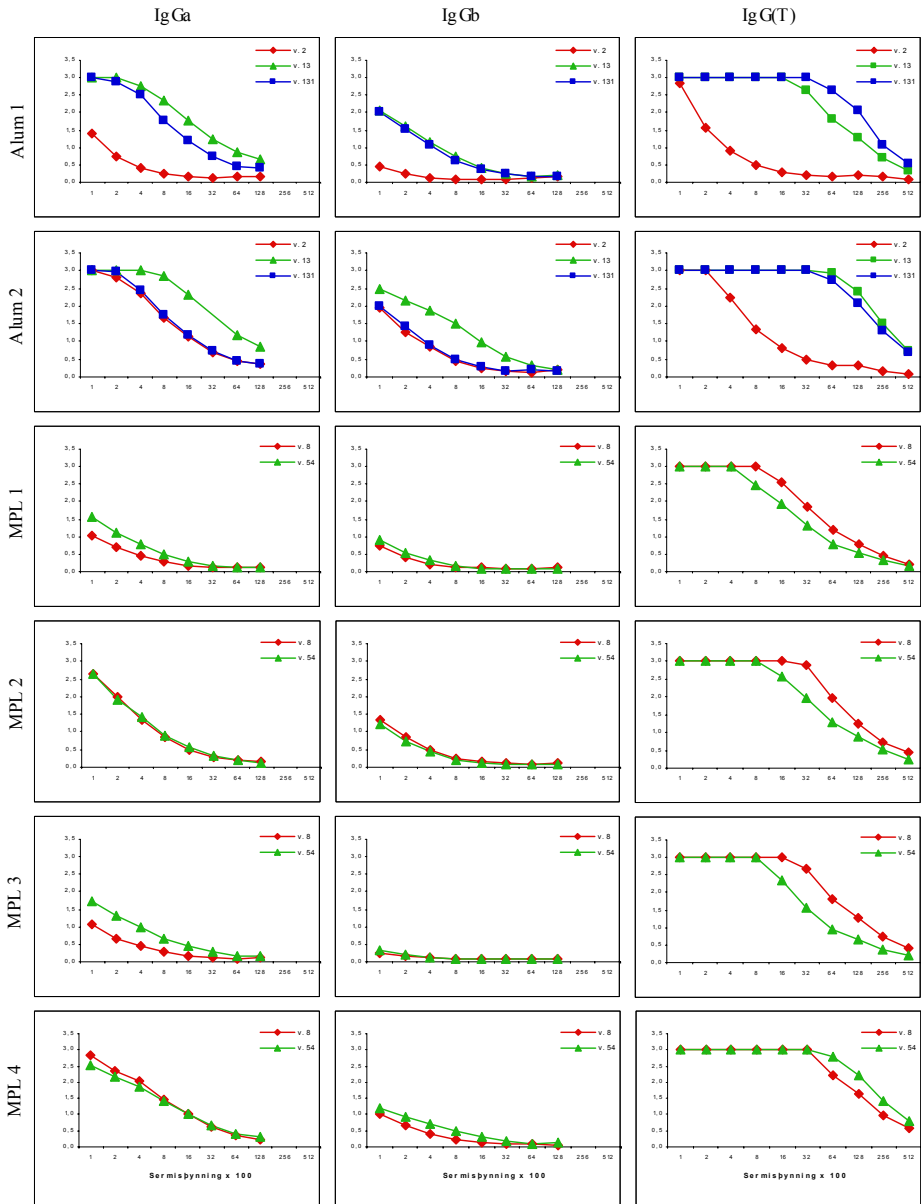
Mynd 33. IgE mótefnasvar hjá HSA/Alum hestum.

Alum 1 er Bjössli og Alum 2 er Kalli. Húðpróf var gert á viku 11 og endurbólusett viku 129. IgE mælingar framkvæmdar af Eliane Marti (Bern, Sviss).



Mynd 34. IgE mótefnasvar hjá HSA/MPL hestum.

MPL 1 er Dvergur, MPL 2 er Svarthöfði, MPL 3 er Jakob og MPL 4 er Svali. Þrjár bólusetningar, viku 0, 6 og 52. IgE mælingar framkvæmdar af Eliane Marti (Bern, Sviss).



Mynd 35. IgG undirflokkasvörum.

IgG undirflokkasvörum 2 vikum eftir aðgerðir. Vika 2 eftir fyrri alum/HSA bólusetningu, vika 13 er 2 vikum eftir húðpróf og vika 131 er 2 vikum eftir endurbólusetningu hjá Alum hestunum. Vika 8 er 2 vikum eftir aðra MPL/HSA bólusetningu og vika 54 er 2 vikum eftir þriðju MPL/HSA bólusetningu hjá MPL hestunum. Á Y-ás er Gleypni. Alum 1 er Bjössí, Alum 2 er Kalli, MPL 1 er Dvergur, MPL 2 er Svarthöfði, MPL 3 er Jakob og MPL 4 er Svali.

og 3 vikum eftir þriðju bólusetningu (niðurstöður ekki sýndar). Þegar borin voru saman mótefnasvör 2 vikum eftir 2. bólusetningu og 2 vikum eftir 3. bólusetningu kom í ljós að IgGa og IgGb mótefnasvörin hækkuðu aðeins (IgGa hækkaði hjá MPL 1 og 3) eða voru svipuð eftir þriðju bólusetningu. IgG(T) mótefnasvörin lækkuðu aðeins nema hjá einum hesti, Svala hækkaði IgG(T) svarið (mynd 35). IgG undirflokkar MPL hestanna voru mældir eftir fyrstu bólusetningu en svörin voru hverfandi og því ekki sýnd.

4.4.3 IL-4 og IFN- γ framleiðsla hjá hestum bólusettum með HSA/Alum og HSA/MPL

Hvítfrumur voru einangraðar og síðan örvaðar *in vitro* með HSA í 24 tíma. Mælingar voru gerðar með rauntíma PCR á IL-4, IFN- γ og β -actin framleiðslu.

Phytohaemagglutin (PHA) var notað sem jákvætt viðmið og æti sem neikvætt viðmið.

IFN- γ /IL-4 hlutfallið var aðeins hærra hjá HSA/MPL hestunum (2 v. e. 2.

bólusetningu) heldur en hjá HSA/Alum hestunum (sjá niðurstöður í töflu 11). Boðefni HSA/Alum hesta var einnig mælt eftir 4 tíma örvun en gildin sem fengust voru lág og sýndu engan mun (niðurstöður ekki sýndar). Boðefnamælingar HSA/Alum hesta 2 vikum eftir húðpróf var gert yfir vetrartímam þegar erfitt var að hreinsa hvítfrumur úr blóði og var viðmiðið frekar hátt sökum ósértækrar örvunar.

Tafla 11. Boðefnaframleiðsla, örvun með HSA.

Alum 1 er Bjössli, Alum 2 er Kalli, MPL 1 er Dvergur, MPL 2 er Svarthöfði, MPL 3 er Jakob og MPL 4 er Svali.

Alum	2 vikum eftir 1. bólus.		2 vikum eftir húðpróf	
	1	2	1	2
IFN- γ	23,3	9,0	4,5	7,4
IL-4	12,7	11,6	2,9	7,0

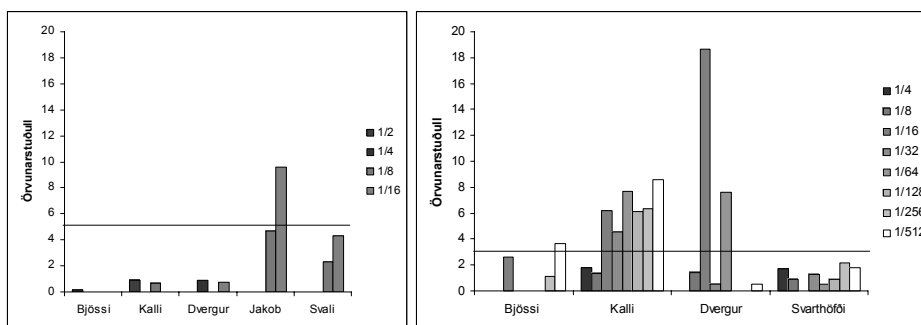
MPL	2 vikum eftir 1. bólus.				2 vikum eftir 2. bólus.				2 vikum eftir 3. bólus.			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
IFN- γ	0,0	1,7	4,7	1,2	2,2	5,6	10,3	41,5	1,2	3,5	9,8	184,4
IL-4	2,1	1,6	1,7	1,0	1,6	2,1	1,5	5,3	0,9	3,1	2,6	50,3

4.5 Mótefna og boðefnasvörun gegn γ -herpesveiru hjá hestum, Th1 ónæmissvar

Athuga átti samsetningu mótefna- og boðefnasvars og kanna hvort hægt væri að nota örvun með γ -herpes til að skilgreina Th1 ónæmissvar í hestum en flestir fullorðnir hestar eru dulsýktir af γ -herpes.

4.5.1 Eitilfrumufjölgun hjá hestum bólusettum með HSA/Alum og HSA/MPL, örvað með γ -herpesveiru

Eitilfrumufjölgunarpróf voru gerð með γ -herpesveiru og með viðmiðunar frumufloði. Hestarnir Bjösssi, Kalli, Dvergur, Jakob og Svali svöruðu í eitilfrumufjölgunarprófi og eru greinilega sýktir af γ -herpes (mynd 36) sem sýndi að hægt væri að nota γ -herpesveiruna í elísupróf til að mæla mótefnasvör og í hvítfrumuörvun til að mæla boðefnasnið.

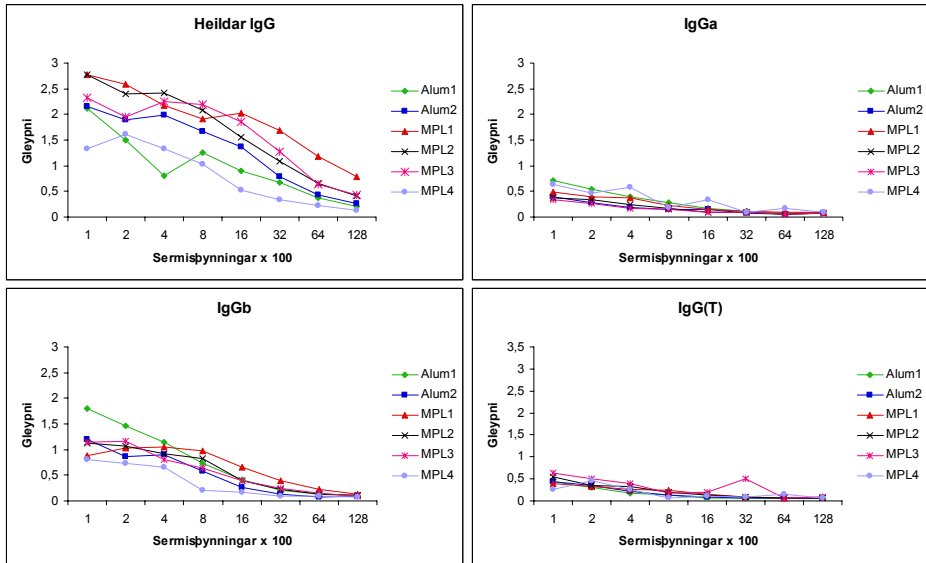


Mynd 36. Eitilfrumufjölgun, örvað með γ -herpes.

4.5.2 γ -Herpes sértæk mótefnasvörun hjá HSA/Alum og HSA/MPL hestunum

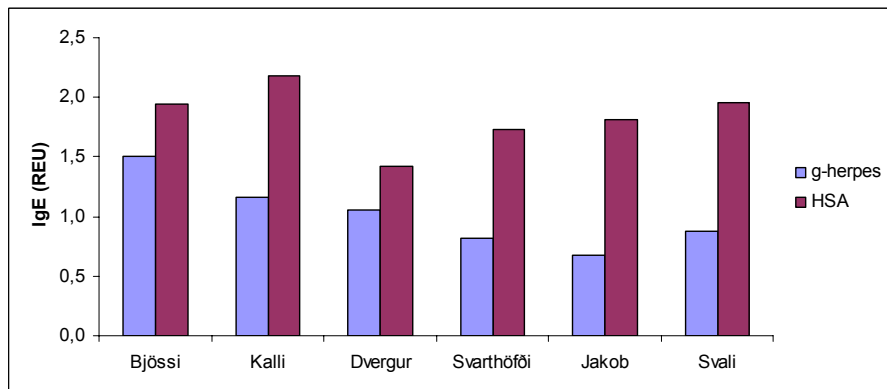
Gerðar voru mælingar á γ -herpes sérvirkum mótefnum, IgG, IgG undirflokkum og IgE, í elísuprófi á hestunum 6 sem bólusettir höfðu verið með HSA próteini og alum eða MPL glæðum. Sértækt IgG mótefnasvar gegn γ -herpes mældist hjá öllum hestunum og þeir svöruðu aðallega með IgGb undirflokki en IgGa og IgG(T) var mun

læggra (mynd 37). Sérþækt IgE mótefnasvar gegn γ -herpes mældist hjá öllum hestunum (mynd 38).



Mynd 37. Heildar IgG og IgG undirflokka mótefnasvar, örvun með γ -herpes.

Elísuprófin voru framkvæmd af Mieke Roelse (Keldum).



Mynd 38. Samanburður á IgE mótefnasvari gegn γ -herpesveiru og HSA.

Framkvæmt af Eliane Marti (Bern, Sviss).

4.5.3 IL-4 og IFN- γ framleiðsla eftir γ -herpes örvun

Mælingar voru gerðar á boðefnunum með PCR á rauntíma eftir 24 tíma *in vitro* örvun á hvítfrumum með γ -herpes vaka. Allir hestarnir svöruðu með meiri IFN- γ framleiðslu heldur en IL-4 (tafla 12).

Tafla 12. Boðefnaframleiðsla, örvun með γ -herpesveiru.

Alum 1 er Bjösssi, Alum 2 er Kalli, MPL 1 er Dvergur, MPL 2 er Svarthöfði, MPL 3 er Jakob og MPL 4 er Svali. H1 - H4 eru viðmiðunarhestar frá Keldum sem ekki hafa verið sprautaðir með HSA.

γ -Herpes	Alum1	Alum2	MPL1	MPL2	MPL3	MPL4	H1	H2	H3	H4
IFN- γ	11,1	15,3	10,2	4,9	22,2	6,7	1,1	6,2	24,8	25,5
IL-4	2,4	1,4	1,7	1,1	4,0	2,1	0,9	2,0	5,7	2,6

UMRÆÐUR

Sumarexem er mun algengara í hestum sem fæddir eru á Íslandi og eru fluttir út en í íslenskum hestum sem fæddir eru erlendis, þó öll hrossakyn geti fengið ofnæmið. Þetta hefur áhrif á hrossaútflutning þar sem vænlegra er að kaupa hesta fædda erlendis sem eru í minni hættu á að fá sjúkdóminn. Sumarexem er ofnæmi gegn próteínum sem berast í hross við bit smámýs af ættkvíslinni *Culicoides*, en tegundir af þessari ættkvísl lifa ekki hér á landi. Það er ekki til neitt bóluefni né góð lækning eða lyfjameðferð við ofnæminu en til að koma í veg fyrir sumarexem er besta ráðið að halda hestunum á einn eða annan hátt frá *Culicoides* flugunum. Hestarnir eru oft illa haldnir og því áriðandi fyrir velferð hestanna að finna lausn á ofnæminu. Erfitt er að koma í veg fyrir útflutning á flugusvæði sem eru nær alls staðar nema við sjó og upp í fjöllum og eftir að hestarnir eru á annað borð komnir upp á meginlandið er erfitt að koma í veg fyrir flutning milli svæða.

5.1 Boðefnamælingar í hestum

Ekki eru til tilbúin próf til að mæla boðefni í hestum en í mönnum og músum eru boðefnapróteínin mæld með mótefnum og hægt að kaupa tilbúin próf og mæla nokkur boðefni í einu. Til þess að geta mælt hvort hesturinn er að svara á Th1 eða Th2 braut þá verður að vera hægt að nema svarið með einhverju móti. Eina örugga leiðin er að mæla boðefnin en þau eru sameindir sem hvítfrumurnar seyta í mjög litlu mæli. Prófaðar hafa verið mismunandi aðferðir (SYBR Green og Lightcycler™) af sumarexem rannsóknarhópnum á Keldum til að mæla mRNA boðefnaframleiðslu í hestafrumum með rauntíma PCR og er núna komin ásættanleg aðferð til að mæla framleiðslu mismunandi boðefna (TaqMan).

Boðefnamælingarnar með TaqMan aðferðinni voru þróaðar og prófaðar á cDNA sem einangrað var úr hestunum sem bólusettil höfðu verið með sitthvorri HSA ferjunni (G og H1) en sökum skorts á samanburði og ósértækrar örvunar í FCS æti voru niðurstöður ekki nothæfar. Ýmsar breytur voru prófaðar eins og mismunandi DNA magn til að spara cDNA og á miðju ferli var settinu sem býr til cDNA breytt hjá framleiðanda og þá voru prófaðar mismunandi uppskriftir. Einnig var prófað að hirða frumuræktirnar og einangra RNA eftir örvun í mislangann tíma (4, 8, 18 og 24 tíma) til að finna út hvaða tímapunktur sýndi hámarks framleiðslu hvers boðefnis.

Sem fulltrúi fyrir Th1 braut var mælt IFN- γ en IL-4 fyrir Th2 braut. IL-5 var einnig prófað fyrir Th2 braut en sýndi ekki hækkun miðað við viðmið. Vegna lykilhlotverks stjórnfurmu í ófnæmi væri áhugavert að líta á stjórnboddefnin IL-10 og TGF- β . Mælingar á IL-10 voru í undirbúningi en erfiðlega gekk að framleiða IL-10 ferju og fá nægilega góða flúrljómun og þarfnast þessi mæling nánari útfærslu. β -actin var notað sem búsyslugen til samanburðar. Til hönnunar á staðalkúrfu fyrir β -actin voru notuð 2 vísapör, 3 mismunandi þreififarar og 2 mismunandi ferjur áður en ætlunarverkið tókst.

TNF- α genabútur var klónaður inn í bluescriptferju og mæling á TNF- α framleiðslu sett upp til mælingar á meðfædda ónæmissvarinu.

5.2 Samanburður á HSA tjáningu ferja *in vitro*

Eitt frumskilyrði þess að DNA bóluefni virki er að það sé vel tjáð í frumum þess sem er bólusetur (Babiuk et al., 2003). Því var reynt að hanna ferju sem er vel tjáð í hestafrumum. HSA tjáning sjö mismunandi spendýratjáningarferja var borin saman í fjórum gerðum hestafrumurækta og COS-7 til samanburðar. Ferjurnar pcDNA3.1/GS og pcDNA3.1/V5-His með HSA geninu á, höfðu verið prófaðar í hestum og gáfu báðar lágt ónæmissvar og voru ekki nógu Th1 stýrandi. Með intron A og heilri Kozak röð tókst okkur að endurbæta tjáningu ferjanna í hestafrumum.

Sýnt hefur verið fram á aukningu í umritunarvirkni vegna innraða hjá mörgum genum í mismunandi vefjum. Innraðir eru fjarlægð af splæsikornum og það getur haft áhrif á mRNA ferlið eins og upphaf umritunar gens, editing og polyadenylation formRNA og kjarnaútflytning, þýðing og niðurbrot mRNA afurðanna (Le Hir et al., 2003).

Í ljós kom að ekki dugði að hafa bara intron A til að fá góða tjáningu. W1 og V1 ferjurnar sem hafa intron A en ekki Kozak raðir tjáðu HSA í um töluvert minna mæli í öllum frumuræktum en G og H1 ferjurnar sem eru með Kozak. Innsetning á intron A í H1 til að fá H2 minnkaði líka HSA tjáningu. Það gæti reyndar stafað af því að intron A var ekki límt inn á réttan stað á ferjunni m.t.t. CMV stýrilsins. Reynt var að klóna CMV stýril og intron A úr VR1012 beint inn í staðinn fyrir CMV stýrilinn sem var fyrir á G og H1 ferjunum og einnig reynt að setja intron A inn á fleiri staði eins og beint fyrir aftan CMV stýrilinn en það tókst ekki (sjá mynd af ferju í viðauka B).

Sýnt hefur verið að basaraðirnar sem umlykja AUG byrjunartáknann á mRNA gegna mikilvægu hlutverki við að auðkenna AUG byrjunartáknann. Basaröðin sem umlykur upphafstáknann er þekkt sem “Kozak consensus sequence”, GCCRCCAUGG. G í +4 sætinu og R (A/G) í -3 sætinu miðað við upphafstáknann hafa ákveðna sérstöðu því ef þá basa vantar getur það valdið því að mun minna er tjáð (Kozak, 2005). Þessi upphafstákni þýðinga beinir ríbósómum á upphaf prótein myndunar á mRNA. 40S ríbósómali undireiningar byrja á 5' enda mRNA og skannar eftir basaröðinni uns komið er að fyrsta AUG tákninum. Ríbósómin byrja að þýða við fyrsta AUG táknann en ef þar er veik eða engin Kozak röð halda sum ríbósóm áfram að skanna niður eftir mRNA þar til það ber kennsl á annan AUG tákna. Þetta er kallað lek skönnun (leaky scanning) (Kozak, 2005).

Þó að G og H1 ferjurnar hefðu einungis haft part af Kozak röðinni, ttCACCATGa og aattCCATGa, voru þær vel tjáðar í COS-7 frumunum (mynd 13) og í hesta lungnafrumum en í minna mæli í húðfrumum og illa í skeifugarna- og nýrnafrumum (myndir 14 og 15). W1 og V1 ferjurnar hafa ekki Kozak röð (ccgcttATGa) og voru þær verr tjáðar í frumunum en hinar ferjurnar (myndir 14 og 15). Heil Kozak röð, GCCACCATG, var sett inn í tvær ferjur, W2 og V2 sem innihéldu intron A. Í hestafrumuræktunum jók W2 og V2 með Kozak röðinni mjög svo HSA tjáninguna miðað við W1 og V1. Í húð-, lungna- og nýrnafrumum var tjáning W2 og V2 svipuð og hjá G og H1 ferjunum en í skeifugarnafrumunum var tjáningin meiri (myndir 14 og 15). Þegar frumur voru hirtar eftir 24 tíma sást meiri tjáning hjá þessum tveim ferjum heldur en hinum í lungna- og skeifugarnafrumunum.

Eftirtektarvert er að ferjur sem innihalda intron A hafa öðruvísi próteinbúta mynstur í WB en ferjurnar án intron A. Ferjurnar með intron A hafa fleiri próteinbönd og þau eru oft á tíðum mjög sterk og mynstrin eru breytileg milli frumurækta og eftir 24 og 48 tíma frumuhirðingu, en þau sjást minna eftir 48 tíma. Engin haldbær skýring er á þessum aukapróteinböndum en kannski má rekja þetta til þess að það hafi verið meiri umritun og kjarnaúflutningur vegna þess að intron A var fjarlægð af splæsikornum og því hafi orðið meira niðurbrot vegna próteinrjúfandi ensíma í umfryminu. Þessi auka próteinbönd eru tjáð HSA prótein sem eru numin af V5 mótefni. Kannski ýtir intron A undir ósérvirka tjáningu frá öðrum ATG-um sem eru inn í HSA geninu og eru í fasa við V5. Splæsítákn (splicing signals) í intronum geta aukið umritun með því að ýta RNA polymerase II af stað og auka skilvirkni (Le Hir et al., 2003).

pBudCE4.1/lacZ/CAT viðmiðunarferjan virkaði ekki sem skildi til að auðvelda samanburðinn á ferjunum sjö sem var verið að prófa í hestaræktunum þar sem lágt DNA magn af ferjunum einum og sér og stundum með öðrum ferjum mældist ekki.

5.3 Ónæmissvörun hesta við örvun CpG raða og peptíða *in vitro*

Sýnt hefur verið fram á að viss peptíð og ákveðnar ómetyleraðar kirnaraðir úr bakteríum (CpG stef) geta virkað sem Th1 ónæmisglæðar. CpG ODN hefur verið tengt við vaka, Amb a 1 úr ódáinsjurt (ragweed) og það hefur gefið góða raun í ónæmismeðferð í mönnum. Með því að gefa CpG ODN tengt við Amb a 1 sex sinnum fékkst marktækt hærra IFN- γ og marktækt lægra IL-5 miðað við þá sem fengu lyfleysu, sem gaf til kynna að boðefnasniðið hefði færst í áttina að Th1 braut (Tsalik, 2005). Poly-L-Arginine virkar vel í peptíð bóluefni þar sem það hefur sýnt sig ræsa öflugt T frumusvar sem endist lengi (Mattner et al., 2002). Einnig er hægt að efla T frumusvar með blöndu af CpG-ODN og pR (Lingnau et al., 2002). Glæðaáhrif MDP hafa minna verið rannsökuð en í vissum blöndum getur það ræst Th1 svar (Moschos et al., 2006; Petrovsky and Aguilar, 2004).

Þrjár bluescriptferjur voru prófaðar í eítílfrumufjölgunarprófi. Örvað var með bluescriptferju, tómri, með 8 auka eintökum af hestastefjum eða með 8 auka eintökum af músastefjum. Ferjan með auka hestastefjunum örvaði frumufjölgun meira (3 af 5 hestum) en ferjan með auka músastefjunum (1 af 5 hestum) (myndir 17-18). Frumufjölgun örvaðist einnig af tómri bluescriptferju (2 af 5 hestum) (myndir 17-18). Tóm bluescriptferja og ferja með hestastefjunum örvaði smávegis umfram HSA en ekki ferja með músastefjunum (mynd 18).

Prófað var hvort Polyarginine (pR) og Muramyl dipeptid (MDP) örvi í eítílfrumufjölgunarprófi. MDP örvaði ekki eitt og sér nema hjá einum hesti (mynd 20) eða í miklum styrk (mynd 19 og 24). PR örvaði eítílfrumur úr fimm af sjö hestum þegar það var notað án vaka. PR jók örvun ef það var notað með vaka sem hestarnir höfðu ónæmissvörun gegn en ekki MDP (myndir 19, 21, 22, 24).

Í þessum tilraunum var því veitt athygli að erfiðara var að aðskilja blóð úr hestunum yfir háveturinn (nóvember - mars). Færri PBMC fengust og erfiðara var að losna við blóðflögur. Tekið var tillit til þessa í framhaldinu en þetta hafði áhrif á örvun hvítfrumna til að nota í boðefnamælingar og frumufjölgunarpróf. Fylgst var

með blóðgildum í rannsóknarhestunum og sást árstíðarbundin sveifla í mælingunum (óbirt gögn).

Frumufjölgunarpróf mælir áunnið ónæmissvar eða T frumu svörun (fjölgun) en mælir ekki örvun meðfædda svarsins sem CpG stefin og peptíðin ættu að örva þegar þau eru notuð ein og sér. Frumufjölgunarprófið var notað sem forpróf til að finna út hvaða styrk væri best að nota fyrir mælingu á boðefnaframleiðslu hvítfrumna.

Fyrir eitilfrumufjölgunarprófin voru ferjur einangraðar með “Midiprep” setti frá QIAGEN. Með þeirri aðferð er hætta á að eittraðar afurðir frá bakteríunni fylgi með sem geta örvað ósértækt í frumurækt. Fyrir örvun hvítfrumna og mælingu á boðefnaframleiðslu voru ferjur einangraðar með “QIAGEN EndoFree Plasmid Mega” setti sem fjarlægir eiturafurðir bakteríunnar eins og LPS til að koma í veg fyrir ósértæka örvun. Ræktun á bakteríum ummynduðum með ferjum með 8-10 CpG stefjum gekk mjög illa og verr eftir því sem innskotin voru stærri og virtust þessi stærri innskot vera eitruð. Mun minna ferju DNA fékkst til prófunar úr þessum ræktum. Reynt var að rækta upp við lægra hitastig en það gekk ekki fyrir bluescriptferjur með 10 CpG stef en með lægra hitastigi var hægt að einangra smá magn af bluescriptferjum með 8 CpG stefjum (sjá töflu 10).

Kjörstyrkur LPS til frumuörvunar var prófað í frumufjölgunarpróf. Þar sem örvun var ekki sjáanleg í þynningum 0,08 - 12,5 µg/ml eftir 2 daga var ákveðið að nota ekki minni styrk en 10 µg/ml og ekki meira en 50 µg/ml vegna hugsanlegra eituráhrifa. LPS örvar aðallega smáætur (monocytes) sem framleiða TNF- α , IL-6, TGF- β og IL-10 en PHA örvar aðallega T frumur til að framleiða IFN- γ , IL-5 og IL-10 (Hussain et al., 2002). Nota átti LPS sem jákvætt viðmið fyrir TNF- α framleiðslu.

TNF- α og IFN- γ framleiðsla hvítfrumna úr hestum sem örvaðar voru með CpG röðum og peptíðum var athuguð með áherslu á TNF- α framleiðslu. TNF- α er aðallega framleitt af stórátfrumum (macrophages), NK frumum og T frumum og hefur mörg hlutverk og er meðal annars eitt af frumbólgu boðefnunum (Ebert, 2005). Við forkönnun kom í ljós að best væri að mæla TNF- α framleiðslu eftir 4 tíma en IFN- γ framleiðslu eftir 24 tíma en þá fengust hæstu gildi þessara boðefna þegar þrjú tímamarkar voru prófaðir (mynd 26) sem ber saman við fyrri athuganir á boðefnaframleiðslu eftir örvun á PBMC úr hestum (Giguere and Prescott, 1999). TNF- α framleiðsla í viðmiðunarsýnunum var alltaf frekar há sem bendir til ósértækrar örvunar í ætinu og truflaði það niðurstöðurnar.

LPS reyndist örva afar takmarkaða TNF- α framleiðslu hjá báðum hestunum (myndir 25-27) og virtist því ekki gott jákvætt viðmið. En þegar frumuræktanir voru skoðaðar í smásjá sást greinilega örvun í brunnunum, stórar frumur með minni frumum í kring (klumpun) strax eftir 4 tíma. Þegar frumuræktunarbakkar voru skoðaðir eftir hirðingu frumna sáust frumur sem sátu eftir fastar við plastið. Möguleg skýring á því að lítil TNF- α framleiðsla mældist er að frumurnar sem festust í holunum við örvun og voru ekki losaðar af eru kannski aðalframleiðslufrumur TNF- α . PHA örvaði IFN- γ framleiðslu mjög vel og einnig TNF- α eftir 4 klst og virkaði því sem skyldi.

Það er þekkt hjá ýmsum spendýrum að einstaklingar bregðast mismundi við LPS örvun. Því er haldið fram að erfðabreytileiki próteina sem taka þátt í boðferli LPS örvunar eigi þar þátt. Raðgreining þriggja gena (CD-14, TLR4 og MD-2) í mönnum og músum hefur leitt í ljós erfðabreytileika sem hefur áhrif á ónæmissvörun LPS örvunar. Rannsóknir hafa sýnt að hestar bregðast mismunandi við LPS. Þrír hestar af tíu svöruðu með marktækt lægri TNF- α framleiðslu miðað við meðaltalið en ekki var hægt að tengja breytileika þessara þriggja gena, sem voru raðgreind hjá þeim öllum, við lágt LPS ónæmissvar (Werners et al., 2006).

Tóma bluescriptferjan er með þrjú hestastef og eitt músastef, og virðist örva meiri boðefnaframleiðslu en ferjur með auka CpG stefjum (myndir 27). Þegar fylgst var með í smásjá sást örvun í brunnunum hjá öllum ferjunum líkt og hjá LPS eftir 4 tíma.

PR og MDP örvuðu ekki ein og sér, hvorki myndun IFN- γ né TNF- α en í frumufjölgunarprófinu var sýnt fram á að pR jók á frumufjölgun með og án sértæks vaka en ekki MDP. Þegar frumuræktirnar voru skoðaðar í smásjá sást greinilega örvun í brunnunum hjá pR og MDP. Samkvæmt rannsóknum Lingnau og féлага (2002) örvaði pR ekki IL-6, TNF- α eða IFN- γ framleiðslu eitt og sér sem er í samræmi við mínar niðurstöður. Þeir sýndu einnig fram á að pR með CpG-ODN jók IFN- γ framleiðslu frumna meira en CpG-ODN gerði eitt og sér (Lingnau et al., 2002).

Í það heila mældist lítil TNF- α framleiðsla. Útfæra þarf prófið betur og endurtaka á nokkrum hestum. Hirða þyrfti frumurnar öðruvísi úr brunnunum, t.d. með því að taka ætið af og setja sprengjudúa út á frumurnar, melta í smá tíma og hirða svo og spinna niður. Það er þekkt að stórætur sitji fastar en aðrar frumur. Einnig mætti reyna að gera prófið í eigin (autologus) sermi til að minnka ósértæka örvun. Ólíklegt er að erfðabátturinn eigi sök á þessu því allir þessir ónæmisglæðar koma boðum áfram

í gegnum mismunandi boðkerfi, CpG ræsir TLR9, LPS ræsir TLR2/4 og MDP ræsir NOD2.

Skoða þyrfti hvernig boðefnasniðið er þegar þessi peptíð og CpG ferjur örva með vaka og hvernig þau virka saman, þ.e. pR og CpG ferjurnar með og án vaka. Einnig væri þá áhugavert að mæla fleiri boðefni eins og TGF- β , IL-10 og IL-4 til að skoða þátt Treg og Th2 frumna við örvun mismunandi ónæmisglæða.

5.4 Ónæmissvar hesta sem bólusettir voru með HSA/Alum eða HSA/MPL

Nú eru í örri þróun Th1 stýrandi glæðar sem hægt er að nota til að efla ofnæmisbóluefni. Einn þessara glæða er Monophosphoryl-lipid A (MPL) sem innheldur afeitrað lipíð A úr lípópólísakkaríði (LPS) *Salmonella minnesota* R595 og er Th1 stýrandi glæðir bæði í músum og mönnum (Evans et al., 2003; Larche, 2006). MPL hefur verið notað í forklínískum og klínískum rannsóknum og hefur reynst öruggur og virkur sem ónæmisglæðir í bóluefni í yfir 120.000 skömmtum sem hafa verið gefnir mönnum (Dougan and Hormaeche, 2006). MPL hefur þegar verið leyft til notkunar í mönnum (McCluskie and Weeratna, 2001). Ofnæmisbóluefni með seyði af breyttum grasfrjóum sem er blandað við L-týrosín og MPL hefur sýnt góða virkni í mönnum en eftir aðeins fjórar inngjafir, sem voru gefnar fyrir frjókornatímabilið, fékkst breytt hlutfall í mótefnaframleiðslu. Sérstækt heildar IgG svar hækkaði og það fékkst lægra IgE svar miðað við viðmiðunarhóp (Drachenberg et al., 2001). Annar rannsóknarhópur sem var að skoða virkni bóluefnis úr sama efnivið og gaf bóluefnið einnig fjórum sinnum, mældi aukna IgG1 og IgG4 sértæka mótefnasvörun í meðhöndluðum einstaklingum og það sem meira var minni sértæka IgE mótefnaframleiðslu yfir frjókornatímabilið. Sermi frá meðhöndluðum einstaklingum gat hamlað histamín losun basafrumna *in vitro* (Mothes et al., 2003). T frumusvörun og boðefnamælingar hafa lítið verið skoðaðar við þessa meðferð en vitað er að ofnæmisvakar örva sértækar T frumur *in vitro* (von Baehr et al., 2005).

Samkvæmt rannsóknum Hellberg og félaga (2006) bindast sértæk IgG_a, IgG(T) og IgE mótefni próteinum í bitvökvakirtlum úr *Culicoides* en ekki IgG_b og var marktækur munur á milli hesta með sumarexem og heilbrigðra hesta. Það sem meira er þá voru hestar með sumarexem sem fæddir voru á Íslandi með IgG_a, IgG(T) og IgE

mótefni gegn marktækt fleiri bitvökva próteinum en hestar með sumarexem fæddir í Evrópu (Hellberg et al., 2006). HSA/Alum hestarnir sem eru með ofnæmi svara með sömu mótefnaflokkum þ.e. svöruðu með mjög háu IgG(T), nokkuð lægra IgG_a og varla neinu IgG_b og sýndu kröftugt IgE svar í viku 2 sem var stöðugt a.m.k þar til í viku 11. Að vísu svöruðu MPL hestarnir svipað og framleiddu einnig IgE en svarið dvínaði fljótt. Sýnt hefur verið fram á að IgE mótefni miðli klassískri gerð I ofnæmi í hestum og sé aðaláhrifavaldurinn í meingerð sumarexems en að IgG(T) geti einnig tekið þátt í ofnæmissvarinu (Wagner et al., 2006). Eini hesturinn í HSA/MPL hópnum sem sýnir hækkun í IgG(T) mótefnasvari eftir þriðju bólusetningu er sá sem hefur hæsta IgE mótefnasvarið. Heildar IgG svarið var mun hærra hjá HSA/Alum hestunum og samkvæmt því er Alum sterkari ónæmisglæðir en MPL. Enda hefur MPL ekki forðamyndunaráhrif (depot) eins og alum (Brewer, 2006). Einnig má sjá að bólusetning í húð var mun áhrifameiri en undir húð þar sem svörun eftir húðpróf var mjög öflugt.

Samkvæmt boðefnamælingunum var IFN- γ /IL-4 hlutfallið aðeins hærra hjá HSA/MPL hestunum heldur en hjá HSA/Alum hestunum sem bendir til Th1 ónæmissýrandi áhrifa MPL.

Allir hestarnir svöruðu með meiri IFN- γ heldur en IL-4 framleiðslu eftir *in vitro* örvun á eitelfrumum með γ -herpes og aðallega með IgG_b undirflokki sem bendir til Th1 svars eins og búast má við gegn latent veiru (Mizukoshi et al., 2002). Mælingar sýndu aftur á móti IgE mótefnasvar gegn γ -herpes. Því miður náðist ekki að mæla IgE mótefnasvar gegn γ -herpes hjá hestum sem ekki eru fæddir á Íslandi. Það er ljóst að svar MPL hestanna gegn HSA var ekki jafn augljóst Th1 svar eins og gegn γ -herpes. En svarið er þó nokkuð frábrugðið því sem HSA/Alum ofnæmishestarnir sýndu. Bæði hvað varðar IFN- γ mælingu og óstöðugt IgE svar. En IgE svar gegn γ -herpes var þó nokkuð hátt og ljóst að IgE svar hesta er allt öðruvísi en í mönnum og músum sem ekki eru sníkjudýra sýkt. Þegar heildar IgE mótefnasvar var skoðað í hestum frá Íslandi áður en þeir voru fluttir út og borið saman við hesta í Sviss sást að meðaltal hestanna á Íslandi var miklu hærra eða 121.970 ng/ml en meðaltal hestanna fædda í Sviss sem var 23.523 ng/ml. Heildar IgE í sermi lækkaði í hestum fæddum á Íslandi ári eftir útflutning og hélt áfram að lækka í þeim sem fengu ekki sumarexem en hækkaði aftur í hestum sem fengu síðan sumarexem. Einnig voru hestarnir sem fæddir voru á Íslandi og fluttir út með verri sumarexem einkenni (Wilson et al., 2006). Líklega má rekja hátt IgE í blóðvökva hesta til sníkjudýrasýkinga. Hestar á Íslandi eru

ef til vill ekki eins oft ormahreinsaðir og hestar í Sviss. Þeir eru mjög einangraðir og innflutningur á hrossum hingað bannaður. Margir sjúkdómar sem finnast í hestum erlendis eru ekki til hér. Þegar hitasóttin gekk í hestum á Íslandi (1998) sýndu rannsórnir að af u.þ.b. 30 veirutegundum sem þekktar eru í hestum erlendis eru einungis 9 veirutegundir hér landlægar og þar með voru íslensku hestarnir sýktir af fjórum herpesveirum (Svansson, 2004). Hestar á Íslandi eru ekki bólusettir gegn veirusýkingum eins og reglulega er gert erlendis.

Fjölmargar rannsóknir hafa sýnt neikvæða fylgni á milli ofnæmissjúkdóma og ormasýkinga í músum og mönnum. Ónæmisviðbrögð við flestum sníkjudýrum eru Th2 háð en samt sýna mörg dæmi að ormasýkingar geta varið hýsilinn gegn Th2 miðluðu ofnæmi. Langvarandi ormasýkingar hafa bælandi áhrif á ónæmiskerfið fyrir tilverkan IL-10 sem einnig bælar ofnæmisviðbrögð (Carvalho et al., 2006; Maizels, 2005). Aftur á móti virðist annað vera upp á teninginum hjá hestum á Íslandi því þrátt fyrir mjög hátt heildar IgE magn í blóði sem gefur til kynna verulega ormasýkingu, þá mælist mjög lágt IL-10 hjá íslenskum hestum sem fluttir eru til Sviss (Hamza et al., 2006). Mælingar á boðefnum hesta sýndu að innfluttir hestar framleiða marktækt minna IL-10 í kjölfar *in vitro* örvar en íslenskir hestar fæddir í Sviss, sem jafnvel sást hjá óörvuðum frumum. Í sömu rannsókn sást að það var lækkun á IFN- γ en hækkun á IL-4 tjáningu hjá hestum með sumarexem yfir sumartímenn. Íslenskir innfluttir hestar sem síðar fengu sumarexem voru með marktækt hærri IL-4 tjáningu en heilbrigðir innfluttir hestar og hestar fæddir í Sviss með og án sumarexem. Það sem meira er þá var varla mælanleg IL-4 tjáning í hestum fæddum í Sviss, miðað við hesta flutta inn frá Íslandi, hvort sem þeir fengu sumarexem. En bælinguna má líklega rekja til hærri IL-10 tjáningar (Hamza et al., 2006).

Það sem hefur líklega mest um það að segja hvort einstaklingar fá ofnæmi er ónæmisreynsla þeirra frá fæðingu og jafnvel í móðurkviði, umhverfi og erfðir (Maizels, 2005). Hestar á Íslandi virðast vera með sterkt Th2 ónæmissvar sem má ef til vill rekja til ónæmisreynslu þeirra þ.e. til fárra veirusýkinga (Th1) og stöðugrar sníkjudýrabyrði (Th2) frá unga aldri. Þar að auki alast þeir ekki upp með orsakavaldi ofnæmisins. Í ljósi þessa gæti það reynst erfðara en ætlað var, samkvæmt niðurstöðum úr músum, að Th1 ónæmisstýra fullorðnum hestum fæddum á Íslandi. Rannsóknirnar styðja það sem æ betur kemur í ljós að örðugt er að yfirfæra niðurstöður um ónæmissvörun og bólusetningar á milli dýrategunda og nauðsynlegt er að framkvæma tilraunir á þeim dýrum sem eiga í hlut.

Niðurstöður verkefnisins eru mikilvægt innlegg í rannsóknir varðandi ónæmissvörun hesta og ónæmismeðferð. En íslenski hesturinn og sumarexemið eru mjög áhugavert rannsóknarefni á sviði ónæmis- og ofnæmisfræði. Tækifæri gefst til að bera saman hesta af sama uppruna en úr mismunandi umhverfi og með ólíka ónæmisreynslu. Það er að segja hesta sem alast upp erlendis, hesta hér á landi sem eru einangraðir frá ýmsum algengum sjúkdómum og ofnæmisvakanum og hesta þar sem einangrunin er rofin við útflutning.

HEIMILDASKRÁ

- Akdis, M., K. Blaser, and C.A. Akdis. 2005. T regulatory cells in allergy: novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 116:961-8; quiz 969.
- Anderson, G.S., P. Belton, E. Jahren, H. Lange, and N. Kleider. 1996. Immunotherapy trial for horses in British Columbia with *Culicoides* (Diptera:Ceratopogonidae) hypersensitivity. *J Med Entomol.* 33:458-66.
- Anderson, G.S., P. Belton, and N. Kleider. 1988. The hypersensitivity of horses to *Culicoides* bites in British Columbia. *Can Vet J.* 29:718-723.
- Anderson, G.S., P. Belton, and N. Kleider. 1993. Hypersensitivity of horses in British Columbia to extracts of native and exotic species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *J Med Entomol.* 30:657-63.
- Babiuk, L.A., R. Pontarollo, S. Babiuk, B. Loehr, and S. van Drunen Littel-van den Hurk. 2003. Induction of immune responses by DNA vaccines in large animals. *Vaccine.* 21:649-58.
- Baldridge, J.R., and R.T. Crane. 1999. Monophosphoryl lipid A (MPL) formulations for the next generation of vaccines. *Methods.* 19:103-7.
- Barbet, J.L., D. Bevier, and E.C. Greiner. 1990. Specific immunotherapy in the treatment of *Culicoides* hypersensitive horses: a double-blind study. *Equine Vet J.* 22:232-5.
- Barouch, D.H., N.L. Letvin, and R.A. Seder. 2004. The role of cytokine DNAs as vaccine adjuvants for optimizing cellular immune responses. *Immunol Rev.* 202:266-74.
- Baselgia, S., M.G. Doherr, P. Mellor, S. Torsteinsdottir, T. Jermann, A. Zurbriggen, T. Jungi, and E. Marti. 2006. Evaluation of an in vitro sulphidoleukotriene release test for diagnosis of insect bite hypersensitivity in horses. *Equine Vet J.* 38:40-6.
- Bjornsdottir, S., J. Sigvaldadottir, H. Brostrom, B. Langvad, and A. Sigurdsson. 2006. Summer eczema in exported Icelandic horses: influence of environmental and genetic factors. *Acta Vet Scand.* 48:3.
- Braverman, Y., H. Ungar-Waron, K. Frith, H. Adler, Y. Danieli, K.P. Baker, and P.J. Quinn. 1983. Epidemiological and immunological studies of sweet itch in horses in Israel. *Vet Rec.* 112:521-4.
- Brewer, J.M. 2006. (How) do aluminium adjuvants work? *Immunol Lett.* 102:10-5.
- Brostrom, H., A. Larsson, and M. Troedsson. 1987. Allergic dermatitis (sweet itch) of Icelandic horses in Sweden: an epidemiological study. *Equine Vet J.* 19:229-36.
- Cantlon, J.D., P.W. Gordy, and R.A. Bowen. 2000. Immune responses in mice, cattle and horses to a DNA vaccine for vesicular stomatitis. *Vaccine.* 18:2368-74.
- Carvalho, E.M., L.S. Bastos, and M.I. Araujo. 2006. Worms and allergy. *Parasite Immunol.* 28:525-34.
- Castelruiz, Y., M. Blixenkrone-Moller, and B. Aasted. 2005. DNA vaccination with the Aleutian mink disease virus NS1 gene confers partial protection against disease. *Vaccine.* 23:1225-31.
- Chaplin, D.D. 2006. 1. Overview of the human immune response. *J Allergy Clin Immunol.* 117:S430-5.
- Chodaczek, G., M. Zimecki, J. Lukasiewicz, and C. Lugowski. 2006. A complex of lactoferrin with monophosphoryl lipid A is an efficient adjuvant of the

- humoral and cellular immune response in mice. *Med Microbiol Immunol (Berl)*. 195:207-16.
- Coombs, D.K., T. Patton, A.K. Kohler, G. Soboll, C. Breathnach, H.G. Townsend, and D.P. Lunn. 2006. Cytokine responses to EHV-1 infection in immune and non-immune ponies. *Vet Immunol Immunopathol*. 111:109-16.
- Cordeau, M.E., P. Joubert, O. Dewachi, Q. Hamid, and J.P. Lavoie. 2004. IL-4, IL-5 and IFN-gamma mRNA expression in pulmonary lymphocytes in equine heaves. *Vet Immunol Immunopathol*. 97:87-96.
- Corthay, A. 2006. A three-cell model for activation of naive T helper cells. *Scand J Immunol*. 64:93-6.
- Cramer, R., and C. Rhyner. 2006. Novel vaccines and adjuvants for allergen-specific immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. 18:761-8.
- Cui, Z. 2005. DNA vaccine. *Adv Genet*. 54:257-89.
- Cunningham, F.M., E. Vandergriff, S.R. Bailey, M.F. Sepulveda, N.T. Goode, and D.W. Horohov. 2003. Cloning, expression and biological activity of equine interleukin (IL)-5. *Vet Immunol Immunopathol*. 95:63-72.
- Davidson, A.J., J.E. Hodgkinson, C.J. Proudman, and J.B. Matthews. 2005. Cytokine responses to Cyathostominae larvae in the equine large intestinal wall. *Res Vet Sci*. 78:169-76.
- Deshayes, S., M.C. Morris, G. Divita, and F. Heitz. 2005. Cell-penetrating peptides: tools for intracellular delivery of therapeutics. *Cell Mol Life Sci*. 62:1839-49.
- Dohmann, K., B. Wagner, D.W. Horohov, and W. Leibold. 2000. Expression and characterisation of equine interleukin 2 and interleukin 4. *Vet Immunol Immunopathol*. 77:243-56.
- Doria-Rose, N.A., and N.L. Haigwood. 2003. DNA vaccine strategies: candidates for immune modulation and immunization regimens. *Methods*. 31:207-16.
- Dougan, G., and C. Hormaeche. 2006. How bacteria and their products provide clues to vaccine and adjuvant development. *Vaccine*. 24 Suppl 2:S2-13-9.
- Drachenberg, K.J., A.W. Wheeler, P. Stuebner, and F. Horak. 2001. A well-tolerated grass pollen-specific allergy vaccine containing a novel adjuvant, monophosphoryl lipid A, reduces allergic symptoms after only four preseasonal injections. *Allergy*. 56:498-505.
- Ebert, E.C. 2005. Endogenous inhibitory cytokines repress TNFalpha secretion. *Cell Immunol*. 237:106-14.
- Eder, C., R. Cramer, C. Mayer, R. Eicher, R. Straub, H. Gerber, S. Lazary, and E. Marti. 2000. Allergen-specific IgE levels against crude mould and storage mite extracts and recombinant mould allergens in sera from horses affected with chronic bronchitis. *Vet Immunol Immunopathol*. 73:241-53.
- Ertl, P.F., and L.L. Thomsen. 2003. Technical issues in construction of nucleic acid vaccines. *Methods*. 31:199-206.
- Evans, J.T., C.W. Cluff, D.A. Johnson, M.J. Lacy, D.H. Persing, and J.R. Baldrige. 2003. Enhancement of antigen-specific immunity via the TLR4 ligands MPL adjuvant and Ribi.529. *Expert Rev Vaccines*. 2:219-29.
- Fadok, V.A., and E.C. Greiner. 1990. Equine insect hypersensitivity: skin test and biopsy results correlated with clinical data. *Equine Vet J*. 22:236-40.
- Ferroglio, E., P. Pregel, A. Accossato, I. Taricco, E. Bollo, L. Rossi, and A. Trisciuoglio. 2006. Equine Culicoides hypersensitivity: evaluation of a skin test and of humoral response. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*. 53:30-3.

- Foster, A.P., P. Lees, and F.M. Cunningham. 1995. Platelet activating factor mimics antigen-induced cutaneous inflammatory responses in sweet itch horses. *Veterinary Immunology & Immunopathology*. 44:115-28.
- Garmory, H.S., K.A. Brown, and R.W. Titball. 2003. DNA vaccines: improving expression of antigens. *Genet Vaccines Ther*. 1:2.
- Giese, M., U. Bahr, N.J. Jakob, R. Kehm, M. Handermann, H. Muller, T.H. Vahlenkamp, C. Spiess, T.H. Schneider, G. Schusse, and G. Darai. 2002. Stable and long-lasting immune response in horses after DNA vaccination against equine arteritis virus. *Virus Genes*. 25:159-67.
- Giguere, S., and J.F. Prescott. 1999. Quantitation of equine cytokine mRNA expression by reverse transcription-competitive polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol*. 67:1-15.
- Gurunathan, S., D.M. Klinman, and R.A. Seder. 2000. DNA vaccines: immunology, application, and optimization*. *Annu Rev Immunol*. 18:927-74.
- Halldorsdottir, S., and H.J. Larsen. 1991. An epidemiological study of summer eczema in Icelandic horses in Norway. *Equine Vet J*. 23:296-9.
- Halldorsdottir, S., H.J. Larsen, and R. Mehl. 1989. Intradermal challenge of Icelandic horses with extracts of four species of the genus *Culicoides*. *Res Vet Sci*. 47:283-7.
- Hamza, E., M.G. Doherr, G. Bertoni, T. Jungi, and E. Marti. 2006. Modulation of allergy incidence in Icelandic horses is associated with a change in IL-4 producing T cells. *Submitted to Int. Archives Allergy Immunol*.
- Harrington, L.E., P.R. Mangan, and C.T. Weaver. 2006. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol*. 18:349-56.
- Hartl, A., R. Weiss, R. Hochreiter, S. Scheibelhofer, and J. Thalhamer. 2004. DNA vaccines for allergy treatment. *Methods*. 32:328-39.
- Hellberg, W., A.D. Wilson, P. Mellor, M.G. Doherr, S. Torsteinsdottir, A. Zurbriggen, T. Jungi, and E. Marti. 2006. Equine insect bite hypersensitivity: immunoblot analysis of IgE and IgG subclass responses to *Culicoides nubeculosus* salivary gland extract. *Vet Immunol Immunopathol*. 113:99-112.
- Horohov, D.W. 2000. Equine T-cell cytokines. Protection and pathology. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 16:1-14.
- Hussain, R., A. Kaleem, F. Shahid, M. Dojki, B. Jamil, H. Mehmood, G. Dawood, and H.M. Dockrell. 2002. Cytokine profiles using whole-blood assays can discriminate between tuberculosis patients and healthy endemic controls in a BCG-vaccinated population. *J Immunol Methods*. 264:95-108.
- Johansen, P., G. Senti, J.M. Martinez Gomez, T. Storni, B.R. von Beust, B. Wuthrich, A. Bot, and T.M. Kundig. 2005. Toll-like receptor ligands as adjuvants in allergen-specific immunotherapy. *Clin Exp Allergy*. 35:1591-8.
- Johansson, J., A. Ledin, M. Verneresson, K. Lovgren-Bengtsson, and L. Hellman. 2004. Identification of adjuvants that enhance the therapeutic antibody response to host IgE. *Vaccine*. 22:2873-80.
- Kaisho, T., and S. Akira. 2006. Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol*. 117:979-87; quiz 988.
- Kato, H., T. Ohashi, N. Nakamura, Y. Nishimura, T. Watari, R. Goitsuka, H. Tsujimoto, and A. Hasegawa. 1995. Molecular cloning of equine interleukin-1 alpha and -beta cDNAs. *Vet Immunol Immunopathol*. 48:221-31.
- Kojima, Y., K.Q. Xin, T. Ooki, K. Hamajima, T. Oikawa, K. Shinoda, T. Ozaki, Y. Hoshino, N. Jounai, M. Nakazawa, D. Klinman, and K. Okuda. 2002.

- Adjuvant effect of multi-CpG motifs on an HIV-1 DNA vaccine. *Vaccine*. 20:2857-65.
- Kozak, M. 2005. Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*. 361:13-37.
- Krieg, A.M. 2002. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol*. 20:709-60.
- Kurotaki, T., K. Narayama, T. Oyamada, H. Yoshikawa, and T. Yoshikawa. 1994. Immunopathological study on equine insect hypersensitivity ("kasen") in Japan. *J Comp Pathol*. 110:145-52.
- Lai, W.C., and M. Bennett. 1998. DNA vaccines. *Crit Rev Immunol*. 18:449-84.
- Lange, S., H. Hamann, E. Deegen, B. Ohnesorge, and O. Distl. 2005. [Investigation of the prevalence of summer eczema in Icelandic horses in northern Germany]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 118:481-9.
- Larche, M. 2006. Immunoregulation by targeting T cells in the treatment of allergy and asthma. *Curr Opin Immunol*. 18:745-50.
- Larche, M., C.A. Akdis, and R. Valenta. 2006. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 6:761-71.
- Le Hir, H., A. Nott, and M.J. Moore. 2003. How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. *Trends Biochem Sci*. 28:215-20.
- Lima, K.M., S.A. dos Santos, J.M. Rodrigues, Jr., and C.L. Silva. 2004. Vaccine adjuvant: it makes the difference. *Vaccine*. 22:2374-9.
- Lingnau, K., A. Egyed, C. Schellack, F. Mattner, M. Buschle, and W. Schmidt. 2002. Poly-L-arginine synergizes with oligodeoxynucleotides containing CpG-motifs (CpG-ODN) for enhanced and prolonged immune responses and prevents the CpG-ODN-induced systemic release of pro-inflammatory cytokines. *Vaccine*. 20:3498-508.
- Littlewood, J.D. 1998. Incidence of recurrent seasonal pruritus ('sweet itch') in British and German shire horses. *Vet Rec*. 142:66-7.
- Liu, M.A. 2003. DNA vaccines: a review. *J Intern Med*. 253:402-10.
- Lopez, A.M., M.T. Hines, G.H. Palmer, D.P. Knowles, D.C. Alperin, and S.A. Hines. 2003. Analysis of anamnestic immune responses in adult horses and priming in neonates induced by a DNA vaccine expressing the vapA gene of *Rhodococcus equi*. *Vaccine*. 21:3815-25.
- Luhrs, P., W. Schmidt, R. Kutil, M. Buschle, S.N. Wagner, G. Stingl, and A. Schneeberger. 2002. Induction of specific immune responses by polycation-based vaccines. *J Immunol*. 169:5217-26.
- Lunn, D.P., D. Hannant, and D.W. Horohov. 1998a. Handbook of vertebrate immunology. Academic Press. 343-371 pp.
- Lunn, D.P., M.A. Holmes, D.F. Antczak, N. Agerwal, J. Baker, S. Bendali-Ahcene, M. Blanchard-Channell, K.M. Byrne, K. Cannizzo, W. Davis, M.J. Hamilton, D. Hannant, T. Kondo, J.H. Kydd, M.C. Monier, P.F. Moore, T. O'Neil, B.R. Schram, A. Sheoran, J.L. Stott, T. Sugiura, and K.E. Vagnoni. 1998b. Report of the Second Equine Leucocyte Antigen Workshop, Squaw valley, California, July 1995. *Vet Immunol Immunopathol*. 62:101-43.
- Lunn, D.P., G. Soboll, B.R. Schram, J. Quass, M.W. McGregor, R.J. Drape, M.D. Macklin, D.E. McCabe, W.F. Swain, and C.W. Olsen. 1999. Antibody responses to DNA vaccination of horses using the influenza virus hemagglutinin gene. *Vaccine*. 17:2245-58.
- Maizels, R.M. 2005. Infections and allergy - helminths, hygiene and host immune regulation. *Curr Opin Immunol*. 17:656-61.

- Marciani, D.J. 2003. Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. *Drug Discov Today*. 8:934-43.
- Marti, E., A. Urwyler, M. Neuenschwander, R. Eicher, D. Meier, A.L. de Weck, H. Gerber, S. Lazary, and C.A. Dahinden. 1999. Sulfidoleukotriene generation from peripheral blood leukocytes of horses affected with insect bite dermal hypersensitivity. *Vet Immunol Immunopathol*. 71:307-20.
- Martin, M., S.M. Michalek, and J. Katz. 2003. Role of innate immune factors in the adjuvant activity of monophosphoryl lipid A. *Infect Immun*. 71:2498-507.
- Masihi, K.N. 2000. Immunomodulatory agents for prophylaxis and therapy of infections. *Int J Antimicrob Agents*. 14:181-91.
- Mattner, F., J.K. Fleitmann, K. Lingnau, W. Schmidt, A. Egyed, J. Fritz, W. Zauner, B. Wittmann, I. Gorny, M. Berger, H. Kirlappos, A. Otava, M.L. Birnstiel, and M. Buschle. 2002. Vaccination with poly-L-arginine as immunostimulant for peptide vaccines: induction of potent and long-lasting T-cell responses against cancer antigens. *Cancer Res*. 62:1477-80.
- McCaig, J. 1973. A survey to establish the incidence of sweet itch in ponies in the United Kingdom. *Vet Rec*. 93:444-6.
- McCluskie, M.J., and R.D. Weeratna. 2001. Novel adjuvant systems. *Curr Drug Targets Infect Disord*. 1:263-71.
- McKelvie, J., A.P. Foster, F.M. Cunningham, and A.S. Hamblin. 1999. Characterisation of lymphocyte subpopulations in the skin and circulation of horses with sweet itch (Culicoides hypersensitivity). *Equine Vet J*. 31:466-72.
- Minke, J.M., J.C. Audonnet, and L. Fischer. 2004. Equine viral vaccines: the past, present and future. *Vet Res*. 35:425-43.
- Mizukoshi, F., K. Maeda, M. Hamano, H. Iwata, T. Matsumura, T. Kondo, and T. Sugiura. 2002. IgG antibody subclass response against equine herpesvirus type 4 in horses. *Vet Immunol Immunopathol*. 88:97-101.
- Moschos, S.A., V.W. Bramwell, S. Somavarapu, and H.O. Alpar. 2006. Modulating the adjuvanticity of alum by co-administration of muramyl di-peptide (MDP) or Quil-A. *Vaccine*. 24:1081-6.
- Mothes, N., M. Heinzkill, K.J. Drachenberg, W.R. Sperr, M.T. Krauth, Y. Majlesi, H. Semper, P. Valent, V. Niederberger, D. Kraft, and R. Valenta. 2003. Allergen-specific immunotherapy with a monophosphoryl lipid A-adjuvanted vaccine: reduced seasonally boosted immunoglobulin E production and inhibition of basophil histamine release by therapy-induced blocking antibodies. *Clin Exp Allergy*. 33:1198-208.
- Nakamura, R., A. Matsushashi, N. Yamashita, and T. Yamamoto. 1956. Studies on "Kasen" of horses in Hokkaido. III Research on the actual state of the disease. *Jap. J. Res*. 4:81-88.
- Nicolson, L., M.N. Penha-Goncalves, J.L. Keanie, N.A. Logan, D.J. Argyle, and D.E. Onions. 1999. Cloning and sequencing of horse interleukin-12 and interleukin-18 cDNAs. *Immunogenetics*. 50:94-7.
- Noguchi, H., and S. Matsumoto. 2006. Protein transduction technology: a novel therapeutic perspective. *Acta Med Okayama*. 60:1-11.
- Paillot, R., J.M. Daly, V. Juillard, J.M. Minke, D. Hannant, and J.H. Kydd. 2005. Equine interferon gamma synthesis in lymphocytes after in vivo infection and in vitro stimulation with EHV-1. *Vaccine*. 23:4541-51.
- PE_Biosystems. Sequence Detection Systems Quantitative Assay Design and Optimization.
<http://keck.med.yale.edu/affymetrix/rtpcr/quantitative/Assay%20Design%20A>

[nd%20Optimization.pdf#search=%22Sequence%20Detection%20System%20Quantitative%22.](#)

- Pedersen, N.C. 1999. A review of immunologic diseases of the dog. *Vet Immunol Immunopathol.* 69:251-342.
- Petrovsky, N., and J.C. Aguilar. 2004. Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunol Cell Biol.* 82:488-96.
- Quinn, P.J., K.P. Baker, and A.N. Morrow. 1983. Sweet itch: responses of clinically normal and affected horses to intradermal challenge with extracts of biting insects. *Equine Vet J.* 15:266-72.
- Reddy, S.T., M.A. Swartz, and J.A. Hubbell. 2006. Targeting dendritic cells with biomaterials: developing the next generation of vaccines. *Trends Immunol.* 27:573-9.
- Riek, R.F. 1953. Studies on allergic dermatitis ("Queensland itch") of the horse. I. - Description, Distribution, Symptoms and Pathology. *Australian Veterinary Journal.* 29:177-184.
- Romagnani, S. 2004. Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance. *J Allergy Clin Immunol.* 113:395-400.
- Romagnani, S. 2006. Regulation of the T cell response. *Clin Exp Allergy.* 36:1357-66.
- Romito, M., D.H. Du Plessis, and G.J. Viljoen. 1999. Immune responses in a horse inoculated with the VP2 gene of African horsesickness virus. *Onderstepoort J Vet Res.* 66:139-44.
- Rook, G.A., R. Hernandez-Pando, K. Dheda, and G. Teng Seah. 2004. IL-4 in tuberculosis: implications for vaccine design. *Trends Immunol.* 25:483-8.
- Sakaguchi, S. 2006. Regulatory T cells: Meden Agan. *Immunol Rev.* 212:5-7.
- Sasaki, S., F. Takeshita, K.Q. Xin, N. Ishii, and K. Okuda. 2003. Adjuvant formulations and delivery systems for DNA vaccines. *Methods.* 31:243-54.
- Schmallenbach, K.H., I. Rahman, H.H. Sasse, P.M. Dixon, R.E. Halliwell, B.C. McGorum, R. Cramer, and H.R. Miller. 1998. Studies on pulmonary and systemic *Aspergillus fumigatus*-specific IgE and IgG antibodies in horses affected with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Vet Immunol Immunopathol.* 66:245-56.
- Soboll, G., D.W. Horohov, B.M. Aldridge, C.W. Olsen, M.W. McGregor, R.J. Drape, M.D. Macklin, W.F. Swain, and D.P. Lunn. 2003. Regional antibody and cellular immune responses to equine influenza virus infection, and particle mediated DNA vaccination. *Vet Immunol Immunopathol.* 94:47-62.
- Steinbach, F., S. Muel, and I. Beier. 2002. Recombinant equine interferons: expression cloning and biological activity. *Vet Immunol Immunopathol.* 84:83-95.
- Stock, P., R.H. DeKruyff, and D.T. Umetsu. 2006. Inhibition of the allergic response by regulatory T cells. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 6:12-6.
- Suzuki, N., and T. Saito. 2006. IRAK-4 - a shared NF-kappaB activator in innate and acquired immunity. *Trends Immunol.* 27:566-72.
- Svansson, V. 2004. Viral infections in horses in Iceland. In Diseases of the Icelandic horse, An International Symposium in Selfoss, Iceland.
- Swiderski, C.E., G. Sobol, D.P. Lunn, and D.W. Horohov. 2000. Molecular cloning, sequencing, and expression of equine interleukin-6. *Vet Immunol Immunopathol.* 77:213-20.
- Taylor, A., J. Verhagen, C.A. Akdis, and M. Akdis. 2005. T regulatory cells and allergy. *Microbes Infect.* 7:1049-55.

- Thalhamer, J., W. Leitner, P. Hammerl, and J. Brtko. 2001. Designing immune responses with genetic immunization and immunostimulatory DNA sequences. *Endocr Regul.* 35:143-66.
- Tsalik, E.L. 2005. DNA-based immunotherapy to treat atopic disease. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 95:403-10; quiz 410-1, 451.
- van der Haegen, A., M. Griot-Wenk, M. Welle, A. Busato, C. von Tscherner, A. Zurbriggen, and E. Marti. 2001. Immunoglobulin-E-bearing cells in skin biopsies of horses with insect bite hypersensitivity. *Equine Vet J.* 33:699-706.
- van Drunen Littel-van den Hurk, S., V. Gerdt, B.I. Loehr, R. Pontarollo, R. Rankin, R. Uwiera, and L.A. Babiuk. 2000. Recent advances in the use of DNA vaccines for the treatment of diseases of farmed animals. *Adv Drug Deliv Rev.* 43:13-28.
- von Baehr, V., A. Hermes, R. von Baehr, H.P. Scherf, H.D. Volk, K.J. Fischer von Weikersthal-Drachenberg, and S. Woroniecki. 2005. Allergoid-specific T-cell reaction as a measure of the immunological response to specific immunotherapy (SIT) with a Th1-adjuvanted allergy vaccine. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 15:234-41.
- Wagner, B. 2006. Immunoglobulins and immunoglobulin genes of the horse. *Dev Comp Immunol.* 30:155-64.
- Wagner, B., D.C. Miller, T.L. Lear, and D.F. Antczak. 2004. The complete map of the Ig heavy chain constant gene region reveals evidence for seven IgG isotypes and for IgD in the horse. *J Immunol.* 173:3230-42.
- Wagner, B., W.H. Miller, E.E. Morgan, J.M. Hillegas, H.N. Erb, W. Leibold, and D.F. Antczak. 2006. IgE and IgG antibodies in skin allergy of the horse. *Vet Res.* 37:813-25.
- Weaver, C.T., L.E. Harrington, P.R. Mangan, M. Gavrieli, and K.M. Murphy. 2006. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity.* 24:677-88.
- Weiss, R., S. Scheibelhofer, M. Gabler, F. Ferreira, W.W. Leitner, and J. Thalhamer. 2006. Is genetic vaccination against allergy possible? *Int Arch Allergy Immunol.* 139:332-45.
- Werners, A.H., S. Bull, J.C. Vendrig, T. Smyth, R.R. Bosch, J. Fink-Gremmels, and C.E. Bryant. 2006. Genotyping of Toll-like receptor 4, myeloid differentiation factor 2 and CD-14 in the horse: an investigation into the influence of genetic polymorphisms on the LPS induced TNF-alpha response in equine whole blood. *Vet Immunol Immunopathol.* 111:165-73.
- Wheeler, A. 2006. A novel adjuvant complex, tyrosine-MPL, for prophylactic and therapeutic vaccines. *Vaccine.* 24 Suppl 2:S2-40-1.
- Wilson, A.D., L. Harwood, S. Torsteinsdottir, and E. Marti. 2006. Production of monoclonal antibodies specific for native equine IgE and their application to monitor total serum IgE responses in Icelandic and non-Icelandic horses with insect bite dermal hypersensitivity. *Vet Immunol Immunopathol.* 112:156-70.
- Wilson, A.D., L.J. Harwood, S. Bjornsdottir, E. Marti, and M.J. Day. 2001. Detection of IgG and IgE serum antibodies to *Culicoides* salivary gland antigens in horses with insect dermal hypersensitivity (sweet itch). *Equine Vet J.* 33:707-13.
- Xu, Z.L., H. Mizuguchi, A. Ishii-Watabe, E. Uchida, T. Mayumi, and T. Hayakawa. 2001. Optimization of transcriptional regulatory elements for constructing plasmid vectors. *Gene.* 272:149-56.

VIÐAUKI A

Bólusetning hesta með HSA próteini og Alum ónæmisglæði.**Bjössí og Kalli**

Vikur	Aðgerð
0	Bólusetning með HSA próteini og Alum ónæmisglæði
0-11	Blóð tekið vikulega og sermi hirt
11	Húðpróf
12-19	Blóð tekið vikulega og sermi hirt
19-40	Blóð tekið aðra hverja viku og sermi hirt
40-128	Blóð tekið mánaðarlega og sermi hirt
129	Próteinögrun með HSA próteini og Alum ónæmisglæði
128-144	Blóð tekið vikulega og sermi hirt.
144-156	Blóð tekið aðra hverja viku og sermi hirt
156-164	Blóð tekið mánaðarlega og sermi hirt

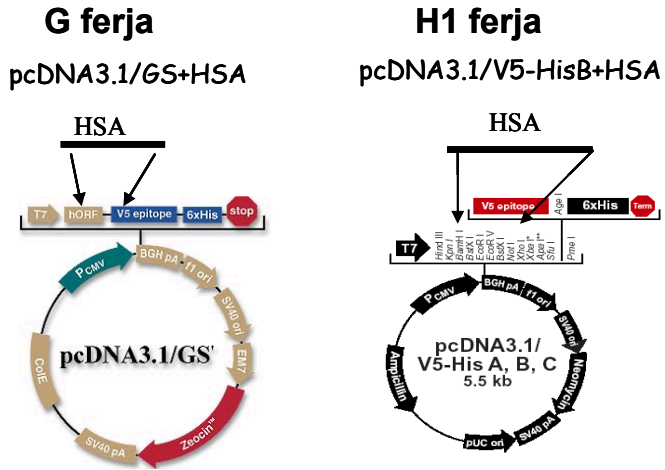
Bólusetning hesta með HSA próteini og MPL ónæmisglæði**Dvergur og Svarthöfði**

Vikur	Aðgerð
0	Bólusetning með HSA próteini og MPL ónæmisglæði
0-6	Blóð tekið vikulega og sermi hirt
6	2. bólusetning með HSA próteini og MPL ónæmisglæði
7-15	Blóð tekið vikulega og sermi hirt
15-35	Blóð tekið aðra hverja viku og sermi hirt
35-51	Blóð tekið mánaðarlega og sermi hirt
52	3. bólusetning með HSA próteini og MPL ónæmisglæði
51-67	Blóð tekið vikulega og sermi hirt
67-83	Blóð tekið aðra hverja viku og sermi hirt (Svarthöfða lógað viku 70)
83-116	Blóð tekið mánaðarlega og sermi hirt

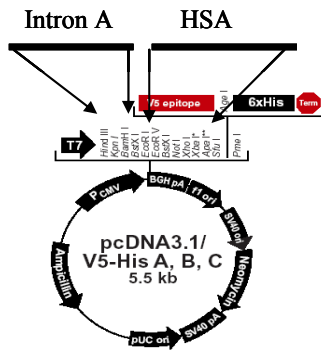
Jakob og Svali

Vikur	Aðgerð
0	Bólusetning með HSA próteini og MPL ónæmisglæði
0-6	Blóð tekið vikulega og sermi hirt
6	2. bólusetning með HSA próteini og MPL ónæmisglæði
7-15	Blóð tekið vikulega og sermi hirt
15-31	Blóð tekið aðra hverja viku og sermi hirt
31-51	Blóð tekið mánaðarlega og sermi hirt
52	3. bólusetning með HSA próteini og MPL ónæmisglæði
51-65	Blóð tekið vikulega og sermi hirt
65-79	Blóð tekið aðra hverja viku og sermi hirt
79-87	Blóð tekið mánaðarlega og sermi hirt

VIÐAUKI B

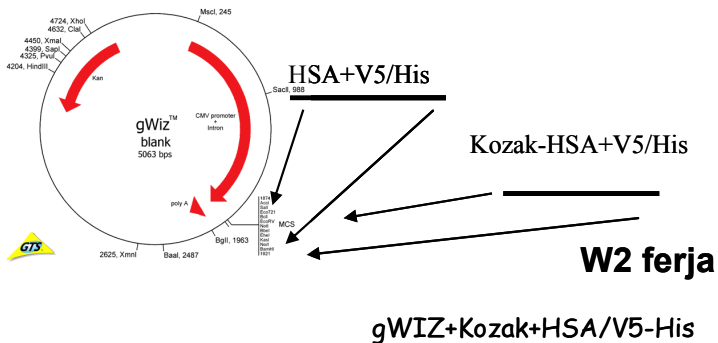


H2 ferja
pcDNA3.1/V5-HisB+IntronA/HSA



W1 ferja

gWIZ+HSA/V5-His



V1 ferja

VR1012+HSA/V5-His

